

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Antonella Geljić**

**Alergijska reakcija na L – asparaginazu i ishod  
liječenja akutne limfoblastične leukemije kod  
djece**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2015.**

**Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za pedijatrijsku hematologiju i onkologiju Klinike za pedijatriju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod vodstvom prof. dr. sc. Ernesta Bilića i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2014./2015.**

## POPIS KRATICA

<b>6 – MP</b> (eng. 6 – <i>Mercaptopurine</i> )	6 - Merkaptopurin
<b>ALL</b> (eng. <i>Acute lymphoblastic leukemia</i> )	Akutna limfoblastična leukemija
<b>AML</b> (eng. <i>Acute myeloid leukemia</i> )	Akutna mijeloična leukemija
<b>APTV</b> (eng. <i>Partial thromboplastin time</i> )	Aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme
<b>ARDS</b> (eng. <i>Acute respiratory distress syndrome</i> )	Akutni respiratorni distress sindrom
<b>BFM</b> (eng. <i>Berlin-Frankfurt-Münster</i> )	BFM protokol
<b>DIK</b> (eng. <i>Disseminated intravascular coagulation</i> )	Diseminirana intravaskularna koagulacija
<b>DNA</b> (eng. <i>Deoxyribonucleic acid</i> )	Deoksiribonukleinska kiselina
<b>ELISA</b> (eng. <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> )	Enzimski imunotest
<b>FAB</b> (eng. <i>French-American-British classification</i> )	Francusko-Američka-Britanska klasifikacija hematoloških bolesti
<b>FDA</b> (eng. <i>Food and Drug Administration</i> )	Američka agencija za hranu i lijekove
<b>FISH</b> (eng. <i>Fluorescence in situ hybridization</i> )	Fluorescentna in situ hibridizacija
<b>GVHD</b> (eng. <i>Graft versus host disease</i> )	Reakcija presatka protiv primatelja
<b>GVL</b> (eng. <i>Graft versus leukemia reaction</i> )	Reakcija presatka protiv leukemije
<b>IM</b> (eng. <i>Intramuscular</i> )	Intramuskularna primjena
<b>ITP</b> (eng. <i>Idiopathic thrombocitopenic purpura</i> )	Idiopatska trombocitopenična purpura
<b>IV</b> (eng. <i>Intravenous</i> )	Intravenska primjena
<b>KML</b> (eng. <i>Chronic myelogenous leukemia</i> )	Kronična mijeloična leukemija
<b>L – ASNase</b> (eng. <i>L – asparaginase</i> )	L - asparaginaza
<b>MLL</b> (eng. <i>Mixed lineage leukemia</i> )	MLL gen
<b>mRNA</b> (eng. <i>messenger Ribonucleic acid</i> )	Glasnička RNA

<b>MTX</b> (eng. <i>Methotrexate</i> )	Metotreksat
<b>PAS</b> (eng. <i>Periodic acid – Schiff</i> )	Perjodni Schiffov reagens
<b>PCR</b> (eng. <i>Polymerase chain reaction</i> )	Lančana reakcija polimeraze
<b>PEG – I – asparaginaza</b> (eng. <i>Polyethylene glycol I - asparaginase</i> )	Pegilirana I - asparaginaza
<b>PRES</b> (eng. <i>Posterior reversible encephalopathy syndrome</i> )	Sindrom stražnje reverzibilne encefalopatije
<b>PV</b> (eng. <i>Prothrombin time</i> )	Protrombinsko vrijeme
<b>RER</b> (eng. <i>Rapid early responders</i> )	Pacijenti s brzim ranim odgovorom
<b>RNA</b> (eng. <i>Ribonucleic acid</i> )	Ribonukleinska kiselina
<b>SF</b> (eng. <i>Submerged fermentation</i> )	Uzgoj na vlažnoj podlozi
<b>SSF</b> (eng. <i>Solid state fermentation</i> )	Uzgoj na čvrstoj podlozi
<b>SŽS</b> (eng. <i>Central nervous system</i> )	Središnji živčani sustav
<b>TDM</b> (eng. <i>Therapeutic drug monitoring</i> )	Terapijsko praćenje koncentracije lijeka
<b>TdT</b> (eng. <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase</i> )	Terminalna deoksinukleotid transferaza
<b>VZV</b> (eng. <i>Varicella zoster virus</i> )	Varicella zoster virus

## SADRŽAJ

1. SAŽETAK .....	
2. SUMMARY .....	
3. UVOD.....	1
3.1. Akutna limfoblastična leukemija .....	1
3.1.1. Definicija .....	1
3.1.2. Epidemiologija i etiologija .....	1
3.1.3. Podjela.....	2
3.1.4. Klinička slika .....	5
3.1.5. Dijagnoza.....	7
3.1.6. Liječenje .....	9
3.1.7. Prognoza.....	12
3.2. L – asparaginaza .....	13
3.2.1. Definicija .....	13
3.2.2. Mehanizam djelovanja .....	14
3.2.3. Farmakokinetika .....	15
3.2.4. Alergijska reakcija .....	17
3.2.5. Protutijela na l - asparaginu .....	18
3.2.6. Ostali neželjeni štetni učinci .....	20
3.2.7. Interakcije s drugim lijekovima .....	21
4. CILJEVI RADA .....	23
4.1. Pretpostavka.....	23
5. ISPITANICI I METODE .....	24
5.1. Ispitanici.....	24
5.2. Metode .....	24
6. REZULTATI .....	25
7. RASPRAVA .....	37
8. ZAKLJUČCI .....	40
9. ZAHVALE.....	41
10. LITERATURA .....	42
11. ŽIVOTOPIS.....	51

## 1. SAŽETAK

Alergijska reakcija na l – asparaginasu i ishod liječenja akutne limfoblastične leukemije kod djece

Antonella Geljić

Akutna limfoblastična leukemija (ALL) najučestalija je zloćudna novotvorina dječje dobi s ukupnim preživljenjem od oko 80%. Bitan napredak u liječenju ALL – a postignut je uvođenjem lijeka l – asparaginaze u polikemoterapijske protokole 1970 – ih godina. Iako ključan za uspjeh liječenja, njegova upotreba ograničena je razvojem neželjenih štetnih učinaka, prvenstveno alergijske reakcije. U ovom retrospektivnom radu ispitivali smo utječe li razvoj alergijske reakcije na l – asparaginasu na ishod liječenja djece s ALL - om. Ispitivana skupina sastojala se od 123 djeteta liječenih po ALL IC – BFM 2002 protokolu. Alergijsku reakciju razvilo je 33,3% djece, koji su nakon toga primali zamjensku terapiju PEG – l – asparaginazom ili *Erwinia* l – asparaginazom. Nismo dokazali statistički značajnu razliku preživljenja djece s alergijskom reakcijom na l – asparaginasu u odnosu na djecu bez alergijske reakcije. Značajne razlike u preživljenju nije bilo obzirom na skupinu rizika, primjenu zamjenskog lijeka i spol ispitanika. Zbog velike uloge l – asparaginaze u liječenju ALL – a potrebna su daljnja istraživanja sa svrhom boljeg razumijevanja njezinog djelovanja, odabira odgovarajućeg pripravka i doze s najmanje neželjenih štetnih učinaka.

Ključne riječi: akutna limfoblastična leukemija, l – asparaginaza, alergijska reakcija

## 2. SUMMARY

Allergic reaction to L – asparaginase and treatment outcome in children with acute lymphoblastic leukemia

Antonella Geljic

Acute lymphoblastic leukemia is the most common malignancy in childhood with overall survival of approximately 80%. An important improvement in ALL treatment was achieved by adding L – asparaginase to multi – agent chemotherapy in 1970s. Although it is essential for successful treatment outcome, its use is limited by toxicity, primarily allergic reaction. In this retrospective study we wanted to determine whether there is a correlation between allergic reaction to L – asparaginase and the outcome of the treatment of children with ALL. Our study included 123 children treated according to ALL IC – BFM 2002 protocol. Allergic reaction occurred in 33,3% children who were later given one of the alternative therapies, either PEG – L – asparaginase or *Erwinia* L – asparaginase. There was no statistically significant survival difference between the children who developed allergic reaction to L – asparaginase and those who did not. There was no significant difference when it comes to risk group, alternative therapy and gender. Considering its essential role in the treatment of ALL further research is needed, especially in the areas of mechanism of action, selection of appropriate preparation and dosing schedule with the least amount of toxicity.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, L – asparaginase, allergic reaction

### **3. UVOD**

#### **3.1. Akutna limfoblastična leukemija**

##### **3.1.1. Definicija**

Akutna leukemija je zloćudna bolest nastala nekontroliranim dijeljenjem nezrelih bijelih krvnih stanica (blasta) zaustavljenih u određenoj fazi sazrijevanja. Razvija se u koštanoj srži, gdje su normalne hematopoetske stanice zamijenjene leukemijskim. Zloćudno promijenjene stanice ne sazrijevaju, ubrzano se i nekontrolirano dijele. Leukemije mogu biti akutne i kronične. Akutne nastaju klonalnim bujanjem mijeloidnih ili limfoidnih blasta, dok kronične nastaju iz zrelijih stanica (Boranić 2003). Akutna limfoblastična leukemija (ALL) najučestalija je zloćudna novotvorina dječje dobi, čini 30% do 35% svih zloćudnih bolesti dječje dobi. Šezdesetih godina prošlog stoljeća ovo je bila smrtonosna bolest za veliku većinu oboljele djece, s preživljenjem manjim od 1%. Danas je preživljenje djece i adolescenata s ALL - om oko 80%, zahvaljujući razvoju različitih protokola liječenja. ALL bez liječenja završava smrtnim ishodom unutar jednog do šest mjeseci (Smith & Hann 2006). Liječenje se zasniva na procijenjenom riziku, koji se određuje na osnovi bioloških karakteristika i odgovora na početnu terapiju. Cilj liječenja je postići veće izlječenje kod visokorizičnih pacijenata te smanjiti nepoželjne učinke liječenja kod niskorizičnih pacijenata. Prognoza liječenja ovisi i o podtipu, koji se određuje temeljem morfoloških, imunofenotipskih, citogenetskih i citokemijskih nalaza. Povrat bolesti javlja se u 20% do 25% djece koja imaju nepovoljnu prognozu (Imbach 2011).

##### **3.1.2. Epidemiologija i etiologija**

Akutne leukemije čine 97% svih leukemija dječje dobi, od čega ALL čini 75%. Incidencija je tri do četiri novooboljela na 100.000, u Hrvatskoj godišnje oboli 30 – ak djece. Najčešće obolijevaju djeca u dobi između druge i pete godine života, češće dječaci. Etiologija bolesti još je uvijek nepoznata, iako se povezuje s nekoliko rizičnih čimbenika. Primijećena je veća učestalost ALL - a kod djece izložene ionizirajućem zračenju. Pod većim rizikom su i jednojajčani blizanci, ako jedan blizanac oboli od ALL - a u prvih 5 godina života, vjerojatnost da će drugi blizanac oboljeti iznosi 20%. Također, braća i sestre oboljelih od ALL-a imaju dva



do četiri puta veći rizik oboljeti od ALL - a nego ostatak populacije. Djeca s trisomijom kromosoma 21 (Downov sindrom) imaju četrnaest puta veću vjerojatnost obolijevanja od ALL - a. Djeca s oštećenim mehanizmima popravka DNA, primjerice kod Fanconijeve anemije, kao i ona s prirođenom agamaglobulinemijom, također imaju veći rizik. Pod povećanim rizikom su i djeca sa neurofibromatozom tip 1, Bloomovim sindromom, Kostmannovim sindromom, Polandovim sindromom, ataksijom teleangiektazijom, Diamond – Blackfanovom anemijom, Li – Fraumenijevim sindromom i Schwachman – Diamondovim sindromom. Infekcija Epstein – Barrovim virusom povezana je s nastankom endemičnog Burkittova limfoma, kao i s B – staničnim leukemijama. Utjecaj kloramfenikola se također može povezati s nastankom ALL - a, kao i stanja imunodeficijencije (HIV infekcija, Wiskott – Aldrichov sindrom, urođena hipogamaglobulinemija). Primijećena je veća učestalost ALL - a kod pripadnika višeg socioekonomskog statusa (Redner 2011).

### **3.1.3. Podjela**

Podjela ALL – a vrši se na temelju morfoloških, citokemijskih, imunoloških, citogenetskih i molekularnih karakteristika. Testovi potrebni za određivanje podvrste su svjetlosna mikroskopija, citokemijsko testiranje, imunofenotipizacija i citogenetika. Leukemijske stanice su slabije diferencirane stanice, blasti. Stvaranje blasta dio je normalnog postupka stvaranja hematopoetskih stanica. U normalnim okolnostima, blasti čine manje od 5% stanica koštane srži, a u perifernoj krvi nisu prisutni. Ponekad je teško razlučiti normalne blaste od malignih te svaki pronalazak više od 5% blasta u koštanoj srži ili prisustvo blasta u perifernoj krvi treba probuditi sumnju na leukemiju (Silverman LB 2009).

Morfološki, nije jednostavno razlikovati mijeloični blast od limfoidnog blasta. Limfoblasti su manji od mijeloičnih, imaju tanak rub agranulirane citoplazme i imaju ovalnu ili okruglu jezgru, s homogenim kromatinom, te velikim omjerom jezgre i citoplazme. Prema French – American – British (FAB) podjeli razlikujemo podtipove L1, L2 i L3. U podtipu L1 stanice su malene, homogene, s održanom membranom jezgre i malom jezgričicom te velikim omjerom jezgre i citoplazme. U podtipu L2 stanice su veće, s nešto manjim omjerom između jezgre i citoplazme te jednom do dvije jezgrice; u podtipu L3 nalaze se velike vezikularne jezgre i bazofilna citoplazma. Podtip L1 nalazi se kod 85% djece oboljele od ALL – a, podtip L2 kod 14%, a L3 u samo 1% oboljelih. Iako se prije smatralo da podtip L2 ima lošiju prognozu od podtipa L1, danas se FAB podjela ne smatra prognostičkim čimbenikom. Pacijenti s podtipom L3 trebaju biti liječeni po protokolima za Burkittov limfom, s obzirom da su njihove stanice istovjetne stanicama Burkittova limfoma (Silverman LB 2009).

Citokemijski, za razlikovanje ALL - a od akutne mijeloične leukemije (AML), koriste se razna bojanja. ALL limfoblasti su u 80% slučajeva pozitivni na bojanje periodnim Schiffovim reagensom (eng. PAS – *periodic acid – Schiff*), koje boja citoplazmatski glikogen. Limfoblasti su kod 90% pacijenata pozitivni na enzim terminalnu deoksinukleotid transferazu (TdT), koji se nalazi u jezgri te katalizira polimerizaciju deoksinukleozid – monofosfata u jednolančanu DNA početnicu. Bojanja specifična za AML su mijeloperoksidaza, koja je pozitivna u 75% slučajeva, te Sudansko crnilo (Silverman LB 2009).

Imunofenotipski, ALL se dijeli na temelju reakcije monoklonskih antitijela s antigenima na površini stanice. Osnovna podjela je na *nezrelu* B – limfocitnu leukemiju, *zrelu* B – limfocitnu leukemiju i T – limfocitnu leukemiju. *Nezrela* B – limfocitna leukemija najučestalija je i čini 80% do 85% ALL-a. Njezine stanice izražavaju antigene specifične za *nezreli* B – fenotip (CD10, CD19, CD20), razlikuju se od *zrelog* B – limfocitnog fenotipa odsustvom površinskih imunoglobulina. S obzirom na stupanj u kojem je došlo do zaustavljanja sazrijevanja razlikuju se “pro - B” ALL, “pre pre – B” ALL i “pre – B” ALL. “Pro - B” ALL nastaje iz veoma nezrele B stanice te čini 3% do 4% slučajeva. Imunofenotipska značajka je CD10 – negativnost. Najčešće se javlja kod dojenčadi s ALL – om, osobito kod onih koji imaju mutacije *MLL* (eng. *mixed lineage leukemia*) gena na kromosomu 11q23. “Pre pre – B” ALL najčešća je podvrsta *nezrelih* B limfocitnih leukemija te čini 60% do 70% slučajeva. Potječe od zrelije B stanice te na površini izražava biljeg CD10, tzv. *common* imunofenotip (CALLA). “Pre – B” ALL čini 20% do 30% slučajeva, potječe od stanica zrelijih od onih u “pre pre – B”, ali i dalje bez izražavanja površinskih imunoglobulina. Na površini izražava biljege CD10 i HLA – DR. U 25% slučajeva nalazi se kromosomska translokacija t(1;19)(q23;p13), koja je povezana s lošijom prognozom. *Zrela* B – limfocitna leukemija javlja se u 1% do 2% slučajeva, karakterizirana je prisustvom imunoglobulina na površini stanice, najčešće vrste IgM. Biljezi koje izražava na površini su CD19, CD20 i HLA – DR. Morfološki pripada skupini L3. Gotovo je uvijek povezana s jednom od ove tri kromosomske translokacije: t(8;14), t(2;8), t(8;22). Lomovi na kromosomima zahvaćaju *MYC* onkogen na kromosomu 8, gen za teški lanac imunoglobulina na kromosomu 14, te gene za lake lance kapa  $\kappa$  (kromosom 2) i lambda  $\lambda$  (kromosom 22). Klinički je istovjetna Burkittovom limfomu te je liječenje uspješnije ako se primjeni protokol za liječenje Burkittova limfoma nego protokol za ALL. T – limfocitnoj leukemiji pripada 10% do 15% slučajeva, imunofenotipski izražava biljege CD3, CD7, CD5, CD2. Javlja se u kasnijoj dobi od ALL – a, četiri puta češće u dječaka. Pri dijagnozi je prisutan visoki broj leukocita, u kliničkoj slici često nalazimo bolest koja se proširila iz koštane srži, najčešće u limfne čvorove u sredoprsju. Ovaj podtip ima lošiju prognozu od B – limfocitnih leukemija, s ranijim javljanjem povrata bolesti (Silverman LB 2009).

Citogenetskom analizom otkrivamo promjene broja kromosoma ili translokacije koje su prisutne u 85% djece sa leukemijom. Hiperploidijske (maligni klon ima više od 46

kromosoma ili DNA index > 1,6) se nalaze u 25% djece s ALL – om te su povezane s povoljnijim ishodom. Hiperploidne maligne stanice imaju povećanu sklonost podlijevanja apoptozi, nakupljaju velike količine metotreksata i visoko su osjetljive na antimetabolite i L – asparaginazu. Povoljnu prognozu ima i fuzija *TEL/AML1* koja nastaje spajanjem gena *TEL* na kromosomu 12 s genom *AML1* na kromosomu 21. Fuzijski gen *TEL/AML1* inhibira normalnu transkripcijsku aktivnost *AML1* gena koji je uključen u proliferaciju i diferencijaciju hematopoetskih stanica. *TEL/AML1* fuzija povezana je s visokom osjetljivošću na L – asparaginazu, kao i s povećanom osjetljivošću na antracikline i etopozid. Nalazi se u 25% slučajeva te uvijek zajedno s hiperploidijom. Pojavljuje se kod djece do desete godine života, s imunofenotipski “pre pre – B” ALL - om i “pre – B” ALL – om, puno rjeđe s ostalim imunofenotipovima. S nepovoljnijim ishodom povezane su hipoploidije (maligni klon ima manje od 46 kromosoma) i translokacije t(9;22) i t(4;11). Fuzijski gen *BCR/ABL* nastaje spajanjem gena *BCR* na kromosomu 22 s *ABL* genom na kromosomu 9 te uzrokuje abnormalnu aktivnost *ABL* tirozin kinaze, povezanu s povećanom proliferacijom i smanjenom apoptozom. Nalazi se u 3% pedijatrijskih ALL slučajeva, incidencija mu raste s dobi pacijenata te se kod odraslih s ALL – om nalazi u 25% slučajeva. Pojavljuje se kod starije djece, s visokim brojem leukocita i sa zahvaćanjem središnjeg živčanog sustava (SŽS) u vrijeme postavljanja dijagnoze. Kod odraslih s kroničnom mijeloičnom leukemijom (KML) translokacija t(9;22) je prisutna u 95% slučajeva i kodira bjelančevinu p210, dok u pedijatrijskim *BCR/ABL* pozitivnim slučajevima kodira bjelančevinu p190. Preslagivanje *MLL* gena na kromosomu 11 pojavljuje se u 2% slučajeva kod djece starije od jedne godine te u 80% slučajeva dojenačkih leukemija. Postoji više translokacija *MLL* gena, kao što su *MLL/AF4*, nastao translokacijom t(4;11), zatim *MLL/ENL*, nastao translokacijom t(11;19) i *MLL/AF9*, nastao translokacijom t(9;11). Leukemijske stanice s translokacijom *MLL* gena vrlo su otporne na glukokortikoide i L – asparaginazu, ali pojačano osjetljive na nukleozidne analoge citarabin i kladribin. Unatoč intenzivnom liječenju ima nepovoljnu prognozu s preživljenjem manjim od 20%. S nepovoljnim ishodom povezana je i translokacija t(1;19) kojom nastaje *E2A/PBX1* fuzijski gen koji se nalazi u 5% “pre – B” ALL slučajeva. Djeca s Downovim sindromom i ALL – om u 55% do 60% slučajeva imaju mutaciju *CRLF2* gena te zbog svojih genetskih obilježja imaju nepovoljniji ishod od ostalih ALL slučajeva. U T – limfocitnoj leukemiji pojavljuje se mutacija *NOTCH1* gena u 50% slučajeva te translokacija t(5;14) s ekspresijom *HOX11L2* gena u 25% slučajeva (Smith & Hann 2006).

### 3.1.4. Klinička slika

ALL može biti klinički neprimjetna, kao slučajan nalaz u krvnoj slici asimptomatskog djeteta; ili akutna, kao životno ugrožavajuće krvarenje, infekcija ili respiratorna patnja. Klinička slika ovisi o stupnju zahvaćenosti koštane srži i o zahvaćenosti organa izvan koštane srži. U početku je nespecifična te uključuje simptome poput umora, pospanosti, boli u nogama i gubitka apetita. Napredovanjem bolesti limfoblasti zauzimaju sve veći dio koštane srži, potiskuju normalnu hematopoezu te se pojavljuju specifičniji simptomi. Potiskivanjem eritropoeze razvija se anemija, djeca postaju blijeda, umor se češće javlja, javljaju se tahikardija i dispneja. Čest simptom je febrilitet zbog infekcije, kojoj su oboljela djeca podložnija zbog smanjenja broja neutrofila. Potiskivanjem megakariocitopoeze razvija se trombocitopenija te se pojavljuju petehije, modrice, epistaksa, mukozna krvarenja, produžena menstruacijska krvarenja. U vrijeme postavljanja dijagnoze kod većine pacijenata simptomi su prisutni manje od četiri tjedna. Širenjem bolesti limfoblasti izlaze iz koštane srži te infiltriraju limfne čvorove, jetru i slezenu, što se očituje kao limfadenopatija i hepatosplenomegalija. Prilikom postavljanja dijagnoze hepatosplenomegalija je prisutna u 30% do 50% slučajeva, a povećanje jetre i slezene je proporcionalno broju leukocita u perifernoj krvi. Iako je većina simptoma posljedica infiltracije koštane srži i limfnih organa, limfoblasti mogu infiltrirati bilo koji organ u tijelu, što može biti klinički vidljivo ili klinički neprimjetno, vidljivo tek histološkim nalazima i dijagnostičkim pretragama. Zahvaćeni mogu biti središnji živčani sustav, strukture u prednjem medijastinumu, spolno – mokraćni sustav, probavni sustav, koštano – zglobovi sustav, oko, koža, srce i pluća (Silverman LB 2009).

Zahvaćenost SŽS – a definirana je prisustvom limfoblasta u cerebro – spinalnom likvoru, a prisutna je u 1,5% do 10% djece u vrijeme postavljanja dijagnoze ALL – a. Učestalije se javlja kod djece sa *zrelom* B – limfocitnom leukemijom te s T – limfocitnom leukemijom. Većina djece sa zahvaćanjem SŽS – a ima pleocitozu u likvoru te je potrebno učiniti centrifugiranje stanica i bojanje po May – Grünwald – Giemsi kako bi se morfološki mogli prepoznati blasti. Neophodno je temeljem morfologije stanica razlikovati leukemijsku pleocitozu od one uzrokovane infekcijom SŽS – a ili traumom zbog primjene intratekalne kemoterapije. Klinički se rijetko očituje u vrijeme dijagnoze, a može se prezentirati difuznim i fokalnim neurološkim znakovima; znakovima povećanja intrakranijalnog tlaka (glavobolja, povraćanje, edem papile, letargija), napadajima, kočenjem vrata. Paralize moždanih živaca su rijetke, najčešće je zahvaćen VII. moždani živac. Njegova jednostrana paraliza obično prethodi pojavi znakova povećanog intrakranijalnog tlaka. Hipotalamus je rijetko zahvaćen, a njegova zahvaćenost očituje se naglim dobivanjem na težini, poremećajima ponašanja i pojačanom dlakavošću. Limfoblasti mogu ući u SŽS hematogenim širenjem ili rjeđe izravnim

širenjem putem mostnih vena iz zahvaćene koštane srži u lubanjskim kostima. Zahvaćenost SŽS dijeli se u tri stupnja: SŽS – 1 (bez limfoblasta), SŽS – 2 ( $<5 \times 10^6$  leukocita s morfološki uočljivim limfoblastima) i SŽS – 3 ( $\geq 5 \times 10^6$  leukocita s morfološki uočljivim limfoblastima i/ili zahvaćanjem moždanih živaca). Unatoč intenzificiranoj terapiji prisutnost bolesti u SŽS – u i dalje je nepovoljan prognostički čimbenik (Smith & Hann 2006).

Infiltracija timusa limfoblastima nalazi se u 10% pacijenata u vrijeme postavljanje dijagnoze, gotovo uvijek kod pacijenata s T – limfocitnom leukemijom. Radiološki se očituje kao masa u prednjem medijastinumu. Klinički može dovesti do životno ugrožavajućeg stanja zbog pritiska na traheobronhalno stablo ili gornju šuplju venu. U ovakvim stanjima potrebno je hitno započeti sustavnu kemoterapiju. Zbog povećanja timusa može se pojaviti i leukemijski pleuralni izljev. Povećani medijastinalni limfni čvorovi mogu uzrokovati kašalj i dispneju te se češće pojavljuju kod starije djece (Silverman LB 2009).

Klinički vidljiva leukemija testisa kao bezbolno povećanje jednog ili rjeđe oba testisa prisutna je u 1% do 2% dječaka. Nalazi se palpacijom ili ultrazvučnim pregledom te nema prognostički značaj. Češće je okultno zahvaćanje testisa, koje je biopsijom dokazano u 20% dječaka. Nalazi se kod dječaka kojima je ukupni broj leukocita veći od  $25 \times 10^9/l$ . Nema prognostički značaj te rutinska biopsija testisa u vrijeme dijagnoze nije preporučena. Relativno visoka incidencija povrata bolesti u testisima zbog barijere krv - testisi značajno je smanjena primjenom intenzificiranih kemoterapeutskih protokola. Napušteno je i zračenje testisa kod klinički vidljive leukemije testisa te preporučena intenzifikacija kemoterapeutskog protokola. Zahvaćanje bubrega leukemijskim infiltratima može uzrokovati oliguriju ili može biti asptomatsko, u vrijeme postavljanje dijagnoze nalazi se u 18% slučajeva. Prijapizam je jako rijetko prisutan kod dječaka s T – limfocitnom leukemijom i hiperleukocitozom, dok je zahvaćanje jajnika nađeno autopsijom kod 30% djevojčica. Izolirano zahvaćanje jajnika vrlo je rijetko i većina djevojčica ima zahvaćene i druge organe izvan koštane srži (Smith & Hann 2006).

Zahvaćanje kostiju i zglobova je često te se oko 40% djece očituje šepanjem i bolima u kostima i zglobovima. Bol može biti uzrokovana izravnim zahvaćanjem periosta leukemijskim stanicama ili širenjem medularne šupljine limfoblastima. Gotovo uvijek se javlja kod djece koja boluju od *neзреle* B – limfocitne leukemije te imaju normalan broj leukocita bez limfoblasta u perifernoj krvi (tzv. aleukemična leukemija). Zahvaćanje zglobova je rjeđe te može dovesti do kasnijeg postavljanja dijagnoze zbog sličnosti s juvenilnim reumatoidnim artritismom ili reumatskom vrućicom. Radiološke promjene na kostima nalaze se u 20% djece s ALL – om, najčešće su vidljive u dugim kostima, osobito na područjima brzog rasta (koljeno, zapešće, gležanj). RTG promjene uključuju i subperiostalno stvaranje nove kosti, osteolitičke lezije, difuzne demijelinizacije, poprečna prosvjetljenja u metafizama, poprečne

metafizne linije povećane gustoće. Rijetka komplikacija terapije steroidima može biti osteonekroza kuka i koljena (Silverman LB 2009).

Zahvaćanje probavnog sustava najčešće se očituje kao krvarenje, u obliku povraćanja ili kao neprimjetno krvarenje u stolici. Uzrokovano je trombocitopenijom, diseminiranom intravaskularnom koagulacijom (DIK), infiltracijom limfoblasta ili infekcijom. Česte su infekcije usne šupljine *Candidom albicans* za vrijeme kemoterapije te je potrebno provoditi protu – gljivičnu terapiju. Kao posljedica trombocitopenije javljaju se petehije i krvarenja desni, dok neutropenija zajedno s gljivičnom ili bakterijskom upalom dovodi do stvaranja vrijedova. Za vrijeme terapije I – asparaginazom može se pojaviti obilno krvarenje, patološko zgrušavanje, lezija jetre ili nekrotizirajući pankreatitis. Poremećaj jetrene funkcije može biti uzrokovan leukemijskim infiltratima, hepatotoksičnošću kemoterapeutskih lijekova ili virusnim hepatitisom (Silverman LB 2009; Smith & Hann 2006).

Zahvaćanje oka nalazi se u trećine pacijenata u vrijeme postavljanja dijagnoze. Najčešće se radi o retinalnom krvarenju zbog trombocitopenije koje može prethoditi intrakranijalnom krvarenju. Paraliza očnih mišića i edem papile upućuju na zahvaćanje SŽS – a. Zahvaćanje očnog živca može uzrokovati monokularnu sljepoću te je potrebna hitna radioterapija kako bi se očuvao vid (Smith & Hann 2006).

Srčane i plućne komplikacije ALL – a su rijetke. Perikardijalni izljev može se naći kod trećine djece s T – limfocitnom leukemijom i povezan je s pleuralnim izljevom i medijastinalnom masom. Kod pacijenata s visokim brojem leukocita može se razviti sindrom leukostaze te uzrokovati akutni respiracijski distres sindrom (ARDS). Najčešće plućne komplikacije su gljivične i bakterijske upale koje nastaju za vrijeme kemoterapije. Kasna posljedica kardiotoksičnosti antraciklina može biti kardiomiopatija (Smith & Hann 2006).

Zahvaćanje kože limfoblastima je rijetko, osim u slučajevima kongenitalne leukemije. Kožna leukemija očituje se ljubičastim papulama, nodulima ili plakovima.

### **3.1.5. Dijagnoza**

Dijagnoza ALL – a postavlja se isključivo analizom punktata koštane srži. U perifernoj krvi često se nalazi anemija, trombocitopenija te promjene u broju leukocita i diferencijalnoj krvoj slici. U dvije trećine djece nalazi se normocitna, normokromna anemija kao odraz postupnog smanjenja funkcije koštane srži. Zbog potiskivanja eritropoeze smanjen je i broj retikulocita. Prilikom postavljanja dijagnoze trombocitopenija ( $<100 \times 10^9/l$ ) je prisutna kod 80% djece s ALL – om te se obično prva očituje u kliničkoj slici u obliku petehija ili krvarenja iz nosa. Broj leukocita može biti normalan, povišen ili snižen. Kod 20% djece broj leukocita je veći od  $50 \times 10^9/l$ . Kod 5% djece broj leukocita niži je od  $2 \times 10^9/l$ , bez nazočnih blasta u

perifernoj krvi. Oko 10% djece s ALL – om pri postavljanju dijagnoze ima visoki broj leukocita ( $>100 \times 10^9/l$ ), što dovodi do intravaskularnog zgrušavanja deformiranih blasta te opstrukcije protoka krvi u mikrocirkulaciji. Navedeno kao posljedicu može imati lokalnu hipoksemiju, oštećenje endotela, krvarenje i infarkt, posebno u SŽS – u i plućima. Polovica pacijenata ima normalan broj leukocita prilikom postavljanja dijagnoze. Blasti ne moraju biti prisutni u razmazu periferne krvi, a njihovo prisustvo može biti posljedica zahvaćanja koštane srži drugim bolestima (osteopetroza, mijelofibroza, sarkoidoza, granulomatozne infekcije, metastatski tumori). Hipereozinofilija u krvi je rijetka, pojavljuje se s translokacijom t(5;14). Za postavljanje dijagnoze ALL – a neophodna je morfološka, citokemijska, imunofenotipska i citogenetska analiza punktata koštane srži. Dijagnoza se postavlja kada se citološkom i citokemijskom analizom aspirata koštane srži nađe više od 25% blasta. U većini slučajeva koštana srž sadržava više od 50% blasta. Imunofenotipizacijska analiza radi se na protočnom citometru te se njome određuje imunološki podtip leukemije. Citogenetskom analizom otkrivaju se promjene broja kromosoma i različite translokacije. U sklopu postavljanja cjelovite dijagnoze neophodne su i metode molekularne dijagnostike, lančana reakcija polimeraze (PCR) i fluorescentna in situ hibridizacija (FISH), koje nam daju podatke o malignom klonu koji su bitni za praćenje učinkovitosti terapije. Upotrebom PCR - a i FISH - a moguće je pronaći jednu malignu stanicu među više stotina tisuća analiziranih, čime dokazujemo potpunu remisiju bolesti ili postojanje “minimalne ostatne bolesti”. U ostalim laboratorijskim nalazima možemo naći ubrzanu sedimentaciju, povećanu aktivnost enzima laktat dehidrogenaze, povećanje serumskog feritina te povećanje aktivnosti jetrenih aminotransferaza kod zahvaćanja jetre. Poremećeni koagulacijski testovi prisutni su kod pacijenata s vrlo visokim brojem leukocita i sindromom hiperleukocitoze. Analiza likvora je neophodna radi otkrivanja moguće prisutnosti bolesti u SŽS – u te rendgenogram pluća radi procjene stanja zahvaćenosti struktura u sredogruđu (Silverman LB 2009; Smith & Hann 2006).

U diferencijalnoj dijagnozi treba razmotriti idiopatsku trombocitopeničnu purpuru (ITP), aplastičnu anemiju, mijelodisplaziju, mijeloproliferativne poremećaje, juvenilni reumatoidni artritis, infektivnu mononukleozu i metastaze solidnih tumora. ITP je najčešći uzrok naglo nastalih petehija i purpura kod djece. Klinički pregled i nalaz periferne krvi dovoljni su za postavljanje dijagnoze kod nekomplikiranih slučajeva. Ukoliko je dijagnoza ITP - a upitna, ili postoje zabrinjavajući nalazi u statusu, potrebno je učiniti punkciju koštane srži kako bi se isključila ALL. Nalaz aspirata koštane srži bit će uredan s mogućim povišenim megakariocitima. Aplastična anemija, mijelodisplazija i mijeloproliferativne bolesti očituju se slično kao i ALL, vrućicom i infekcijama. Poteškoće mogu stvoriti i različiti artritis i infektivna mononukleoz, koje također započinju vrućicom, bljedoćom, splenomegalijom, bolovima u

zglobovima i limfadenopatijom. Djeca s neuroblastomom često se očituju sa zahvaćenim limfnim čvorovima, slezenom, jetrom ili koštanoj srži. Rjeđe, koštanoj srži mogu zahvatiti rhabdomiosarkom i Ewingov sarkom. Ova stanja razlučit će se od ALL - a nalazom punkcije koštane srži (Silverman LB 2009).

### 3.1.6. Liječenje

Liječenje ALL – a provodi se po posebnim protokolima koji se sastoje od 4 dijela : indukcije remisije, konsolidacije remisije i prevencije širenja leukemije na SŽS, intenzifikacije i terapije održavanja (Pieters & Carroll 2010).

Uvodni dio liječenja (indukcija remisije) započinje odmah nakon postavljanja dijagnoze. Prvih sedam dana uvode se kortikosteroidi radi smanjivanja tumorske mase. Osmi dan radi se punkcija koštane srži zbog analize odgovora na terapiju te se počinju davati citostatici. Uz kortikosteroid, primjenjuju se I – asparaginaza, vinkristin i antraciklinski citostatik, najčešće daunorubicin. Od kortikosteroida primjenjuje se prednizon, iako je nekoliko studija pokazalo da upotreba deksametazona značajno smanjuje rizik povrata bolesti u koštanoj srži i SŽS – u. Taj učinak povezuje se s većim udjelom slobodnog deksametazona u plazmi i boljim ulaskom u SŽS. Upitna je djelotvornost antraciklina kao četvrtog lijeka te jedni preporučuju njegovu primjenu samo kod visoko rizičnih pacijenata, dok drugi smatraju da se treba dodati kod izabrane djece starije od 10 godina. Uvodni dio liječenja traje 4 do 6 tjedana, a cilj mu je postići potpunu remisiju. Potpuna remisija definira se postignućem normocelularne koštane srži s manje od 5% blasta, bez leukemijskih masa ili infiltrata vidljivih na kliničkom pregledu ili slikovnim prikazima te bez leukemijskih stanica u cerebrospinalnom likvoru prikupljenih 33. dan terapije. Potrebno je postići potpunu remisiju prije započinjanja sljedećeg dijela liječenja. Neuspjeh postizanja potpune remisije nalazi se kod manje od 5% pacijenata, često kod pacijenata s početnim visokim brojem leukocita ( $>100 \times 10^9/l$ ), T – staničnim imunofenotipom, sporim odgovorom na početnu terapiju te s Philadelphia kromosomom (t(9;22)). Velika većina djece s početnim neuspjehom postizanja potpune remisije, njih 80% do 90%, postigne potpunu remisiju, no njihovo ukupno preživljenje iznosi samo 20% do 30%. Ishod ovih pacijenata mogla bi poboljšati alogena transplantacija matičnih krvotvornih stanica učinjena u prvoj potpunoj remisiji (Pieters & Carroll 2010).

Konsolidacija remisije i prevencija širenja leukemije na SŽS slijedi nakon postizanja potpune remisije. Potrebna je radi potpunog uništenja leukemijskih stanica te se primjenjuje



druga kombinacija citostatika tijekom 4 do 5 tjedana kako bi se izbjegao nastanak križne rezistencije na lijekove. Prevencija širenja leukemije na SŽS postiže se istodobnom primjenom metotreksata (MTX) intratekalno i velikih doza intravenski radi savladavanja barijere krv – mozak. U konsolidaciji se sistemno primjenjuju metotreksat i 6 – merkaptopurin (6 – MP) (Pieters & Carroll 2010).

Slijedi intenzifikacija u kojoj se primjenjuju lijekovi korišteni u indukciji i konsolidaciji remisije. Dokazano je da smanjuje rizik povrata bolesti. Indukcija remisije, konsolidacija remisije i prevencija širenja bolesti na SŽS te intenzifikacija ukupno traju 6 do 12 mjeseci.

Terapija održavanja daje se još 12 do 18 mjeseci, ovisno o protokolu liječenja. Sastoji se od dnevnog uzimanja 6 – merkaptopurina i tjednog uzimanja MTX – a, primijenjenih peroralnim putem. Potrebno je kontinuirano prilagođavati dozu MTX – a i 6 - MP – a temeljem nalaza periferne krvi kako bi se smanjila mogućnost razvoja infekcije, a istodobno održala dovoljna koncentracija za sprječavanje povrata bolesti. Vrijednost leukocita potrebno je održavati između  $2\text{--}3,0 \times 10^9/\text{l}$ . Cjelokupna terapija traje 24 mjeseca (Pieters & Carroll 2010; Imbach 2011).

Osim navedene terapije djeca s prisutnom bolešću u SŽS i ona s T – imunofenotipom i hiperleukocitozom trebaju primiti i terapiju zračenja mozga. Nakon završetka liječenja djeca se prate još 5 godina te ukoliko ne dođe do povrata bolesti smatraju se izliječenima.

Za vrijeme liječenja i nakon liječenja mogu se razviti razne komplikacije. Rane komplikacije najčešće su metaboličke te se javljaju kod djece s početnim visokim brojem leukocita (hiperleukocitozom). Posljedica su naglog raspada stanica (sindrom lize tumora) što dovodi do oslobađanja velike količine urične kiseline (hiperuricemije), hiperkalijemije i hiperfosfatemije. Hiperuricemija može dovesti do akutnog bubrežnog zatajenja zbog odlaganja urične kiseline u bubrežima te je potrebno provoditi obilnu hidraciju pacijenta i primjenjivati alopurinol. Kao posljedica hiperleukocitoze može doći do razvoja infarkta mozga i pluća. Kod djece s T – ALL – om i velikom medijastinalnom masom može se naglo razviti kompresija bronha ili sindrom gornje šuplje vene. Kao posljedica trombocitopenije mogu se javiti krvarenja. Ozbiljne i česte komplikacije liječenja su infekcije zbog granulocitopenije, koje su najčešći uzrok smrti povezane s liječenjem. Svako febrilno dijete koje boluje od leukemije s brojem neutrofila manjim od  $0,5 \times 10^9/\text{L}$  treba se smatrati bakterijskim i liječiti antibioticima širokog spektra. Većina infekcija je bakterijska, a kao oportunističke infekcije sve češće se javljaju *Candida* i *Aspergillus*. Virusne infekcije, najčešće uzrokovane varicella zoster virusom (VZV) mogu dovesti do pneumonije, hepatitisa i encefalitisa koji značajno povećavaju smrtnost. *Pneumocystis carinii* uzrokuje često smrtonosnu intersticijsku upalu pluća kod djece koja primaju polikemoterapiju, čija se incidencija značajno smanjila

profilaktičkom primjenom ko-trimoksazola. Napretkom liječenja ALL – a zapaža se sve veći broj kasnih komplikacija. Kod dječaka se kao posljedica zračenja testisa može javiti testikularna disfunkcija te je potrebna nadomjesna terapija testosteronom. Zbog pretjerane upotrebe antraciklina dolazi do smanjenja kontrakcije srčanog mišića i razvoja kardiomiopatije. Kao posljedica liječenja usmjerenog na SŽS (sustavnog, intratekalnog ili zračenja) javljaju se promjene vidljive radiološki u četiri oblika; kao subakutna leukoencefalopatija, mineralizirajuća angiopatija, subakutna nekrotizirajuća leukomijelopatija i kortikalna atrofija. Čest je nesrazmjer između radiološkog i kliničkog neurološkog nalaza. Djeca koja su primila terapiju zračenja mozga u ranijoj dobi pokazuju veća neurokognitivna odstupanja. Utjecaj na rast također je veći kod djece koja su zračena u ranijoj dobi, kao i kod djevojčica. Kod 30% preživjelih kao posljedica upotrebe kortikosteroida javljaju se osteopenija, frakture i osteonekroza. Sekundarne novotvorine javljaju se rijetko, najčešće se radi o tumorima mozga, uglavnom gliomima koji se javljaju na mjestima koja su bila zračena (Silverman LB 2009; Smith & Hann 2006).

Unatoč napretku u liječenju ALL – a kod 20% do 30% djece javlja se povratak bolesti, najčešće u koštanoj srži, SŽS i kod dječaka u testise. Mogući uzrok povrata bolesti je postojanje farmakološkog utočišta za zloćudne stanice zbog krvno – moždane ili krvno – testikularne barijere koje priječe ulazak lijeka u terapijskoj koncentraciji. Može se raditi i o otpornosti na lijekove, kao i o postojanju metaboličkih utočišta gdje su stanice u mirovanju ( $G_0$  fazi) te stoga nedostupne djelovanju kemoterapeutika. S obzirom na to da je većina učinkovitih kemoterapeutika korištena u primarnom liječenju, terapija povrata bolesti temelji se na istim lijekovima. Glavni prognostički čimbenici za djecu s povratom bolesti su mjesto povrata bolesti i dužina trajanja prve potpune remisije. Povrat može biti izoliran u koštanoj srži ili u kombinaciji s povratom u drugim organima. Za dijagnozu povrata bolesti u koštanoj srži potrebno je punkcijom naći više od 25% limfoblasta. Može biti vrlo rani ako se javi u prvih 18 mjeseci od početka liječenja, rani ako se javi unutar 6 mjeseci od završetka liječenja (tj. 18-30 mjeseci od početka liječenja) te kasni, ako nastane nakon više od 6 mjeseci od završetka liječenja. Vrlo rani i rani povratak bolesti ima lošiju prognozu te su ova djeca kandidati za alogenu transplantaciju krvotvornih matičnih stanica. Bitan prognostički čimbenik je i postojanje “minimalne ostatne bolesti” na kraju indukcije remisije. Pacijenti kod kojih postoji veća “minimalna ostatna bolest” imaju veći rizik za povratak bolesti i imaju lošije preživljenje. Drugo najučestalije mjesto povratka bolesti je SŽS, gdje se povratak bolesti javlja u oko 5% pacijenata. Za dijagnozu je potrebno pronaći više od  $5 \times 10^6$  limfoblasta/l u cerebro - spinalnom likvoru. Uvijek se provodi intratekalno liječenje te zračenje mozga u kombinaciji sa sustavnom kemoterapijom. Povrat bolesti u testise javlja se kod 2% dječaka. Uz sustavno liječenje primjenjuje se i zračenje oba testisa (Silverman LB 2009; Smith & Hann 2006).

Upotreba alogene transplantacije krvotvornih matičnih stanica u liječenju ALL – a ograničena je neželjenim štetnim učincima i infekcijama koje dovode do smrti uzrokovane liječenjem u 30% pacijenata. Reakcija presatka protiv primatelja (eng. GVHD – *graft versus host disease*) posredovana citotoksičnim T limfocitima glavni je nepoželjni učinak, iako može imati i pozitivan učinak u obliku reakcije presatka protiv leukemije (eng. GVL – *graft versus leukemia reaction*). Uklanjanjem limfocita T iz presatka smanjuje se opasnost od GVHD - a, ali se povećava rizik odbacivanja transplantata i povrata bolesti. Smrtnost je značajno viša kod pacijenata koji su primili transplantat koštane srži od kompatibilnog nesrodnog davatelja nego kod onih koji su ga primili od kompatibilnog srodnog davatelja. Može se primijeniti u prvoj potpunoj remisiji kod visoko rizičnih pacijenata te kod pacijenata s povratom bolesti. U skupinu vrlo rizičnih pacijenata pripadaju pacijenti koji nisu postigli potpunu remisiju nakon 5 tjedana terapije, pacijenti s translokacijom t(9;22) ili t(4;11), oni s hipodiploidijom (smanjen broj kromosoma u malignim stanicama prilikom postavljanja dijagnoze), te pacijenti s brojem leukocita većim od  $100 \times 10^9/l$ . Iako je široko prihvaćena upotreba alogene transplantacije krvotvornih matičnih stanica u drugoj potpunoj remisiji, njezina uloga se treba uspoređivati s uspjehom polikemoterapije. Kod ranog povrata bolesti u koštanoj srži alogena transplantacija krvotvornih matičnih stanica značajno povećava mogućnost preživljenja u odnosu na kemoterapiju. Pacijenti s kasnim povratom bolesti u koštanoj srži mogu se u 35% slučajeva izliječiti intenzivnom polikemoterapijom. Transplantacija matičnih hematopoetskih stanica se svakako mora provesti u drugoj potpunoj remisiji kod pacijenata s nepovoljnim prognostičkim čimbenicima ( *BCR/ABL* – pozitivni pacijenti, *TEL/AML* – negativni pacijenti, loš odgovor na terapiju povrata bolesti nakon 6 tjedana liječenja) te kod svih pacijenata s T – ALL – om (Smith & Hann 2006).

### 3.1.7. Prognoza

Ukupno preživljenje djece s ALL – om iznosi oko 80%. Ovisno o prognostičkim čimbenicima pacijenti se svrstavaju u skupinu standardnog rizika s preživljenjem većim od 90%, skupinu srednjeg rizika s preživljenjem između 75% i 80% te visokorizičnu skupinu s preživljenjem nešto iznad 50%. Prognostički čimbenici mogu se podijeliti u 2 skupine. Prva skupina ovisi o tipu leukemije i početnim nalazima, a druga skupina ovisi o početnom odgovoru na liječenje. Dobar prognostički čimbenik je dob između 1 i 10 godina, kao i hiperploidija ( $>50$  kromosoma, DNA indeks  $>1,16$ ). U nepovoljne prognostičke pokazatelje spada broj leukocita u perifernoj krvi veći od  $50 \times 10^9/l$  na početku liječenja, muški spol, T – imunofenotip, prisutnost bolesti u SŽS – u, postojanje tumorske mase u sredoprsju,

hipoploidija (<44 kromosoma), postojanje Philadelphia kromosoma (t (9;22)) i translokacije t(4;11). Kao odgovor na indukcijsko liječenje gleda se apsolutni broj blasta u perifernoj krvi sedmi dan liječenja te postotak blasta u koštanoj srži sedmi ili četrnaesti dan liječenja. Prisustvo više od 1000 blasta/mm<sup>3</sup> nakon sedam dana monoterapije kortikosteroidima smatra se nepovoljnim prognostičkim čimbenikom. Stanje koštane srži može biti M1 ( $\leq$  5% blasta), M2 ( $\leq$  25% blasta) i M3 ( $>$  25% blasta). Za postizanje potpune remisije potrebno je postići stanje M1, dok je postojanost leukemije u koštanoj srži povezana s lošijim ishodom. Nakon 15 dana liječenja radi se imunofenotipizacija leukemijskih stanica radi utvrđivanja postojanja "minimalne ostatne bolesti". Postojanje "minimalne ostatne bolesti" na kraju indukcijskog dijela liječenja (33. dan) u količini od 0,01% do 0,1% povezano je s većom mogućnošću povrata bolesti i lošijim ishodom u odnosu na pacijente bez prisutne "minimalne ostatne bolesti" (Pieters & Carroll 2010; Redner 2011).

### **3.2. L – asparaginaza**

#### **3.2.1. Definicija**

L - asparaginaza (L – asparagin – aminohidrolaza) (L – ASNase) je enzim koji u zadnjih 50 godina čini jednu od glavnih sastavnica protokola za liječenje ALL – a. Otkriće protu – tumorskih svojstava L – asparaginaze započinje 1953. godine kada je Kidd primijetio da je kod miševa s presađenim limfomom nakon terapije serumom zamorca brzo došlo do potpunog povlačenja bolesti (Kidd 1953). Daljnjim istraživanjima Broome otkriva da je aktivnost asparaginaze u serumu zamorca odgovorna za protu – limfomski učinak (Broome 1961, 1963). Sobin i Kidd otkrivaju da je taj učinak posljedica sprječavanja ugradnje L – asparagina u stanice limfoma (Sobin & Kidd 1966a, 1966b). Konačni dokaz bio je izolacija enzima iz seruma zamorca imunoelektroforezom i demonstracija inhibitornog djelovanja na limfomske stanice (Yellin & Wriston 1966). Pripravci dobiveni iz *Escherichia coli* inhibiraju rast tumora (Mashburn & Wriston 1964; Broome 1965) te se nativna L – asparaginaza počinje proizvoditi kao lijek za upotrebu na ljudima. Učinak postiže hidrolizom L – asparagina u aspartičnu kiselinu i amonijak. Limfoblastične stanice, maligne stanice nemaju sintetazu asparagina te nisu u stanju sintetizirati asparagin već ovise o egzogenim izvorima (Muller & Boos 1998). Manjak L – asparagina inhibira sintezu proteina, smanjuje razinu serumskog asparagina te dovodi do smrti leukemijskih stanica. Glavni neželjeni štetni učinak je preosjetljivost, koja se očituje urtikarijom, vrućicom, tresavicom, mučninom, povraćanjem, a u težim slučajevima bronhospazmom, zatajenjem disanja i hipotenzijom.

### 3.2.2. Mehanizam djelovanja

Asparagin je ne – esencijalna aminokiselina koja se u zdravim stanicama sintetizira iz aspartične kiseline ili se pribavlja prehranom (Asselin & Rizzari 2015). U stanicama se sintetizira pomoću enzima asparagin sintetaze. L – asparaginaza je enzim koji katalizira hidrolizu asparagina u aspartičnu kiselinu i amonijak. Leukemijske stanice nisu u stanju sintetizirati vlastiti asparagin zbog nedostatka ili nedostatne aktivnosti enzima L – asparaginaze te je asparagin za njih esencijalna aminokiselina (Salzer i dr. 2012). L – asparaginaza smanjuje razinu serumskog asparagina te na taj način “izgladnjuje” leukemijske stanice. Nedovoljna količina asparagina dovodi do smanjene sinteze DNA (eng. *deoxyribonucleic acid*), RNA (eng. *ribonucleic acid*) i proteina, smanjenog staničnog rasta i na kraju do apoptozom uzrokovane smrti stanice (Muller & Boos 1998). Specifična je za G<sub>1</sub> fazu staničnog ciklusa. Najbitniji čimbenik za dugoročni uspjeh liječenja L – asparaginazom je potpuno i kontinuirano iscrpljenje asparagina (Asselin & Rizzari 2015). Uobičajena koncentracija asparagina u plazmi je između 40 i 80 µmol/l (Boos i dr. 1996), za najbolji terapijski učinak potrebno je da ona bude ispod 0,1 µmol/l (Vieira Pinheiro i dr. 1999). Za postizanje te razine asparagina potrebno je da aktivnost L – asparaginaze bude najmanje 0,1 IU/ml (Klug Albertsen i dr. 2002). Trenutno su dostupne 3 vrste asparaginaze, 2 dobivene iz *E.coli* i jedna iz *Erwinia chrysanthemi*. Nativna L - asparaginaza i pegilirana L - asparaginaza (PEG – L - asparaginaza) izoliraju se iz *E.coli*, dok se iz *Erwinie chrysanthemi* dobiva *Erwinia* L - asparaginaza (Pieters i dr. 2011). Sva tri oblika imaju isti mehanizam djelovanja, ali različita farmakokinetička obilježja te se stoga ne mogu primjenjivati u jednakim dozama i podjednako učestalo (Asselin i dr. 1993).

Osim djelovanja na asparagin, asparaginaza katalizira i hidrolizu glutamina na glutaminsku kiselinu i amonijak (Covini i dr. 2012). Za najbolji terapijski učinak potrebno je smanjiti serumske razine asparagina i glutamina (Avramis & Panosyan 2005; Panosyan i dr. 2004), jer glutamin sudjeluje u sintezi asparagina (Grigoryan i dr. 2004). Deaminacija glutamina treba biti veća od 90% za postizanje najboljeg terapijskog učinka (Panosyan i dr. 2004). Razina glutamina u krvi je puno viša od razine asparagina te je potrebna veća aktivnost asparaginaze za snižavanje koncentracije obje aminokiseline. Uz to, selektivnost asparaginaze za glutamin je značajno slabija nego za asparagin (Avramis & Panosyan 2005).

Otpornost leukemijskih stanica na L – asparaginazu može dovesti do povećanog stvaranja asparagina te smanjenje učinkovitosti lijeka. Može se razviti kao posljedica regulacije asparagin sintetaze na više (eng. *up – regulation*) i povećane koncentracije

asparagina u leukemijskom mikrookolišu. Regulacija asparagin sintetaze na više zbog izlaganja l – asparaginazi zapažena je kod hiperdiploidnih leukemijskih stanica te kod onih s ETV6 – RUNX1 fuzijom (Stams i dr. 2005; Appel i dr. 2006). Mezenhimske stanice koštane srži, koje čine mikrookoliš leukemijskim stanicama, imaju 20 puta veći izražaj glasničke RNA (eng. *mRNA – messenger Ribonucleic acid*) asparagin sintetaze od leukemijskih stanica, osiguravajući povećane koncentracije asparagina u mikrookolišu. Na taj način štite leukemijske stanice od citotoksičnog učinka l – asparaginaze (Iwamoto i dr. 2007; Fletcher i dr. 2001; Haskell & Canellos 1969; Hutson i dr. 1997).

### 3.2.3. Farmakokinetika

Farmakokinetička obilježja triju pripravaka asparaginaze veoma se razlikuju, što ih ne čini međusobno lako izmjenjivima. Najduži poluvijek eliminacije ( $t_{1/2}$ ) ima PEG – l – asparaginaza, koji iznosi  $5,73 \pm 3,24$  dana nakon intramuskularne (IM) primjene. *Erwinia* l – asparaginaza ima najkraći poluvijek eliminacije od  $0,65 \pm 0,13$  dana, dok nativna l – asparaginaza ima poluvijek eliminacije  $1,44 \pm 0,35$  dana (Asselin i dr. 1993). Pripravci s dužim poluvijekom eliminacije duže se zadržavaju u organizmu te osiguravaju dužu izloženost l – asparaginazi i posljedično tome veće smanjenje koncentracije asparagina. Vršna aktivnost asparaginaze najprije se javlja kod *Erwinia* l – asparaginaze, unutar 24 sata, kod nativne l – asparaginaze nakon 24 do 48 sati, a kod PEG l – asparaginaze nakon 72 do 96 sati. Nakon intramuskularne primjene *Erwinia* l – asparaginaze u dozi od  $25.000 \text{ IU/m}^2$  lijek se nakon 7 dana više nije mogao izmjeriti. Koncentracija PEG – l – asparaginaze 26. dan nakon primjene  $2500 \text{ IU/m}^2$  IM iznosila je više od  $0,01 \text{ IU/ml}$ , dok se nativna l – asparaginaza nakon IM primjene  $25.000 \text{ IU/m}^2$  14. dan više nije mogla izmjeriti (Asselin 1999). Primjena svih triju pripravaka asparaginaza u istim dozama dovodi do značajne razlike u razini aktivnosti asparaginaze te može dovesti do lošijeg ishoda, što može stvoriti zabunu o slabijoj efikasnosti (Moghrabi i dr. 2007; Duval i dr. 2002). Istraživanje koje su proveli Boos i dr. uspoređivalo je koncentraciju asparagina i razinu aktivnosti asparaginaze kod 49 djece koji su primali istu dozu od  $10.000 \text{ IU/m}^2$  sva tri pripravka asparaginaze (Boos i dr. 1996). Pacijenti koji su primali *Erwinia* l – asparaginazu imali su nižu razinu aktivnosti asparaginaze od pacijenata koji su primali nativnu l – asparaginazu ili PEG – l – asparaginazu i manji broj pacijenata koji su postigli potpuno iscrpljenje asparagina ( $\leq 0,1 \text{ mol/l}$ ) (Boos i dr. 1996). Prilikom IV primjene manje od 1% lijeka ulazi u cerebro – spinalnu tekućinu. Zbog kraćeg poluvijeka eliminacije *Erwinia* l – asparaginaza treba se primjenjivati učestalije i u većim dozama od nativne l – asparaginaze i PEG – l – asparaginaze. Preporuke američke Agencije

za hranu i lijekove (eng. *FDA – Food and Drug Administration*) za zamjensku terapiju *Erwinia* I - asparaginazom nakon razvoja alergijske reakcije na pripravke asparaginaze dobivene od *E.coli* su primjena 25.000 IU/m<sup>2</sup> IM za svaku dozu native I – asparaginaze tri puta tjedno te šest doza za svaku planiranu dozu PEG – I - asparaginaze (Salzer i dr. 2012, 2013). Trenutni “AIEOP – Berlin, Frankfurt, Münster (BFM) ALL 2009” protokol preporučuje primjenu 2500 IU/m<sup>2</sup> PEG – I - asparaginaze kao zamjenu za nativnu I – asparaginazu nakon razvoja alergijske reakcije (AIEOP-BFM ALL 2009). Upotrebom terapijskog praćenja koncentracije lijeka (eng. *TDM – therapeutic drug monitoring*) uočavaju se pacijenti s nedovoljnom razinom aktivnosti asparaginaze. Pacijenti s nemjerljivom razinom aktivnosti asparaginaze i kliničkim znakovima alergijske reakcije prebacuju se na *Erwinia* I - asparaginazu. Za svaku dozu PEG – I - asparaginaze primjenjuje se sedam doza od 20.000 IU/m<sup>2</sup> *Erwinia* I - asparaginaze intravenski (IV), svaki drugi dan (AIEOP-BFM ALL 2009).

Pripravci asparaginaze razlikuje se i po imunološkim karakteristikama, anti – I – asparaginaza protutijela najčešće su zabilježena s upotrebom native I – asparaginaze. Protutijela na nativnu I – asparaginazu često pokazuju križnu reaktivnost s PEG – asparaginazom, ali ne s *Erwinia* asparaginazom (Zalewska-Szewczyk i dr. 2009).

Na enzimsku aktivnost I – asparaginaze veoma utječe i varijabilnost među pacijentima (eng. *inter – patient variability*). Nekoliko istraživanja izvijestilo je o različitim aktivnostima asparaginaze među pacijentima koji su primali jednake doze lijeka po jednakom rasporedu (Vieira Pinheiro i dr. 1999; Schrey i dr. 2010; Vrooman i dr. 2013). Schrey i dr. proučavali su razlike u aktivnosti tri pripravka asparaginaze kod 763 pacijenta, najveća grupa (416 pacijenata) primila je 1000 IU/m<sup>2</sup> PEG – asparaginaze. Sedam dana nakon primjene lijeka razina aktivnosti asparaginaze bila je u rasponu od 0 IU/ml do 3,3 IU/ml, s medijanom iznad 0,1 IU/ml. Oko 30% pacijenata imalo je aktivnost manju od 0,1 IU/ml (Schrey i dr. 2010). Vrooman i dr. izvijestili su o različitim aktivnostima lijeka u skupini pacijenata koji su nakon alergijske reakcije na pripravke asparaginaze dobivene od *E.coli* primili 25.000 IU/m<sup>2</sup> *Erwinia* I - asparaginaze. Koeficijent varijabilnosti lijeka izmjeren 48 i 72 sata nakon IV primjene iznosio je između 72% i 109% (Vrooman i dr. 2013).

Razina aktivnosti i postizanje vršne koncentracije asparaginaze ovisi i o načinu primjene lijeka. Intravenska primjena poželjnija je ako dođe do anafilaksije zbog mogućnosti prekida infuzije lijeka te sprječavanja izlaganja pacijenta punoj dozi, što kod intramuskularne primjene nije moguće. Prednost IV primjene je kontinuirana primjena visokih doza bez ponavljajućih i bolnih IM injekcija (Asselin & Rizzari 2015). Vršna koncentracija lijeka brže se postiže nakon IV primjene, ali je i vrijeme izloženosti lijeku kraće u usporedbi s IM primjenom (Albertsen i dr. 2001). Poluvijek eliminacije *Erwinia* I - asparaginaze nakon IV primjene iznosi

6,4 sata (Albertsen i dr. 2002), dok je nakon IM primjene zabilježen poluvijek eliminacije od 15 sati (Asselin i dr. 1993). Slične razlike zabilježene su i kod pripravaka izvedenih iz *E.coli*, čiji je poluvijek eliminacije između 24 i 32 sata (Asselin i dr. 1993; Ho i dr. 1981). Duži poluvijek eliminacije nakon IM primjene posljedica je sporije apsorpcije lijeka što ograničava njegovu eliminaciju. Schrey i dr. pratili su razinu aktivnosti *Erwinia* L - asparaginaze primijenjene u dozi od 10.000 IU/m<sup>2</sup> IM i IV kod pacijenata u reindukciji (Schrey i dr. 2010). Enzimska aktivnost  $\geq 0,1$  IU/ml zabilježena je u većom postotku kod pacijenata nakon IM primjene u odnosu na pacijente koji su lijek primili IV (IM=85%, IV=55%) (Schrey i dr. 2010). Ovo istraživanje ukazuje na potrebu prilagođavanja doze i učestalosti primjene lijeka ovisno o načinu primjene, prilikom IV primjene potrebno je lijek primjenjivati učestalije i u većoj dozi (Asselin & Rizzari 2015).

### 3.2.4. Alergijska reakcija

Iako je L – asparaginaza lijek koji velika većina pacijenata dobro podnosi, značajni neželjeni štetni učinci javljaju se kod 30% pacijenata. Najčešći neželjeni štetni učinak je preosjetljivost, odnosno razvoj alergijske reakcije koja ograničava daljnju upotrebu lijeka (Raetz & Salzer 2010). L – asparaginaza nije protein prisutan u ljudskim stanicama te ima sposobnost izazvati imunološki odgovor organizma (Zalewska-Szewczyk i dr. 2007). Prilikom IV primjene najčešće se očituje kao urtikarija, osip, lokalizirano ili generalizirano crvenilo, edem larinksa, bronhospazam, hipotenzija i rijetko anafilaktički šok (Avramis & Tiwari 2006). Ako se lijek primjenjuje IM nalazi se bolnost, osjetljivost, naticanje i crvenilo na mjestu injekcije. Učestalost razvoja alergijske reakcije iznosi između 10% i 30% među pacijentima koji se prvi put liječe L – asparaginazom (Avramis i dr. 2002; Evans i dr. 1982). Reakcija se obično očituje 30 do 60 minuta nakon primjene lijeka, ali može nastati i nakon nekoliko sati. Čimbenici koji utječu na njezin razvoj su vrsta pripravka asparaginaze, prateća kemoterapija, faza u protokolu kada se lijek primjenjuje, način primjene i postojanje prethodne alergijske reakcije. Pripravci asparaginaze dobiveni od *E.coli* imaju sličnu učestalost razvoja alergije, dok je ona manja s *Erwinia* L - asparaginazom (Moghrabi i dr. 2007). Nije dokazana povezanost između dobi djeteta i učestalosti pojavljivanja alergije (Moghrabi i dr. 2007), a kod odraslih se pojavljuje podjednako učestalo kao i kod djece (Larson i dr. 1998). Iako su prethodne studije povezivale veću učestalost alergijskih reakcija s IV primjenom lijeka (Nesbit i dr. 1979), novija istraživanja dokazuju podjednaku učestalost alergije neovisno o načinu primjene lijeka (Douer i dr. 2007; Müller i dr. 2001; Vieira Pinheiro i dr. 2006). Zajednička primjena asparaginaze i kortikosteroida smanjuje mogućnost razvoja alergijske



reakcije zbog imunosupresivnog učinka steroida (Evans i dr. 1982), ali može i prikriti postojanje subkliničke preosjetljivosti, s nižom razinom aktivnosti asparaginaze (Asselin & Rizzari 2015). Niža učestalost uočena je i kada se asparaginaza primjenjivala češće s kraćim razmacima između faza protokola (Albertsen i dr. 2001; Liu i dr. 2012). Pretpostavlja se da bi velike koncentracije asparaginaze mogle nadvladati imunološki odgovor i smanjiti vjerojatnost nastanka alergijske reakcije u budućnosti (Avramis & Panosyan 2005; Albertsen i dr. 2001). Iako bi neki pacijenti nakon razvoja blage alergijske reakcije mogli ponovno primati nativnu I – asparaginazu ili PEG – I - asparaginazu s prethodnim davanjem premedikacije, premedikacija s upotrebom steroida ili antihistaminika ne preporučuje se radi prikrivanja protutijela koja smanjuju aktivnost lijeka (Panosyan i dr. 2004). Nakon razvoja kliničke ili subkliničke preosjetljivosti potrebno je primjenjivati drugi pripravak asparaginaze, iako se razvoj alergijske reakcije na I – asparaginazu ne povezuje s lošijim ishodom (Silverman i dr. 2001; Woo i dr. 2000; Wacker i dr. 2007; Larson i dr. 1998). Većina pacijenata će nakon razvoja alergijske reakcije na pripravke dobivene iz *E.coli* vrlo dobro podnijeti *Erwinia* I - asparaginazu (Avramis & Panosyan 2005).

### 3.2.5. Protutijela na I - asparaginazu

Pripravci I – asparaginaze bakterijskog podrijetla visoko su imunogeni te izazivaju imunološki odgovor sa stvaranjem protutijela na I – asparaginazu (Panetta i dr. 2009; Zalewska-Szewczyk i dr. 2007; Woo i dr. 2000; Panosyan i dr. 2004). IgG protutijela na I – asparaginazu smanjuju učinkovitost lijeka neutralizirajući aktivnost I – asparaginaze ili povećavajući klirens lijeka (Panosyan i dr. 2004; Zalewska-Szewczyk i dr. 2007). Iako je prisutnost protutijela često povezana s reakcijama preosjetljivosti (Woo , i dr. 2000, 1998), klinički simptomi i znakovi preosjetljivosti nalaze se kod samo 50% slučajeva (Panetta i dr. 2009; Panosyan i dr. 2004), dok su neke alergijske reakcije zabilježene bez prisustva protutijela. Učestalost pojavljivanja protutijela na I – asparaginazu razlikuje se ovisno o istraživanju te kod odraslih iznosi do 79% (Killander i dr. 1976), a kod djece do 70% (Oettgen i dr. 1970). Dio pacijenata stvara protutijela bez kliničkih znakova alergije, što se naziva tiha inaktivacija ili subklinička preosjetljivost (Vieira Pinheiro i dr. 1999). Prisutna je kod 29% pacijenata prilikom prve terapije I – asparaginazom dobivenom iz *E.coli* (Panosyan i dr. 2004), a još češće kod slučajeva povrata bolesti, te je o njoj potrebno misliti prilikom planiranja terapije (Willer i dr. 2011). Imunološka reakcija rijetko se javlja kod prve doze I – asparaginaze, osim kod pacijenata koji su skloni atopiji (Avramis & Tiwari 2006). Otkrivanje protutijela najčešće se izvodi enzimskim imunotestom ELISA (eng. *enzyme – linked*

*immunosorbent assay*, ELISA), iako se razvijaju osjetljivije metode poput SPR – Biacore (eng. *surface plasmon resonance*) (Avramis i dr. 2009). Različiti pripravci asparaginaze imaju različita imunološka svojstva te različitu sposobnost stvaranja protutijela. Incidencija stvaranja protutijela najveća je s nativnom I – asparaginazom te iznosi 60% (Panosyan i dr. 2004). Kod ostalih pripravaka stvaranje protutijela je manje učestalo, prilikom primjene PEG – I - asparaginaze rizik iznosi 2% do 18% (Avramis i dr. 2002; Hawkins i dr. 2004), a kod *Erwinia* I - asparaginaze 8% do 33% (Albertsen i dr. 2002; Wang i dr. 2003). Protutijela koja se razvijaju na nativnu I – asparaginazu često su križno reaktivna na PEG – I - asparaginazu, ali ne i na *Erwinia* I - asparaginazu (Zalewska-Szewczyk i dr. 2009; Willer i dr. 2011). Zbog tog razloga često je preporučena *Erwinia* I - asparaginaza kao zamjena nakon razvoja alergijske reakcije na nativnu I – asparaginazu. Za pacijente liječene po protokolu ALL – BFM 2000 i ALL – Relapse (REZ) BFM 2002 učinak protutijela stvorenih na nativnu I – asparaginazu utjecao je na PEG – I - asparaginazu samo kada je razina protutijela bila veoma visoka. Kod pacijenata s umjerenom razinom protutijela na nativnu I – asparaginazu liječenje PEG – I - asparaginazom postiže zadovoljavajuću plazmatsku razinu asparaginaze (Willer i dr. 2011). Ako je alergijska reakcija bila prisutna zajedno s pojavom protutijela, prisutnost protutijela nije bila povezana s nepovoljnijim ishodom (Woo i dr. 2000). Izostanak alergijske reakcije kod pacijenata s prisutnim protutijelima na nativnu I - asparaginazu povezan je s lošijim ishodom (Panosyan i dr. 2004). Također, veća učestalost protutijela zabilježena je kod pacijenata koji su liječeni po protokolima za niži rizik od onih koji su liječeni po protokolima za srednji i visoki rizik, upućujući na važnost intenzivnijeg kemoterapeutskog protokola u smanjivanju stvaranja protutijela (Liu i dr. 2012).

Upotreba terapijskog praćenja koncentracije lijeka pokazala se kao bitan čimbenik u prilagodbi liječenja. Određuje se koncentracija asparagina, razina aktivnosti asparaginaze i prisutnost i koncentracija protutijela radi procjene potrebe prilagodbe terapije. Prisutnost tihe inaktivacije kao i farmakokinetičke razlike među pacijentima mogu dovesti do nedovoljne aktivnosti asparaginaze i nepovoljno utjecati na ishod liječenja, ako nisu prepoznate na vrijeme (Vrooman i dr. 2010; Vrooman i dr. 2013). Nekoliko grupa (BFM, AIEOP, Dutch Children's Oncology Group) preporučilo je povremeno određivanje aktivnosti asparaginaze i protutijela radi prilagođavanja liječenja (AIEOP-BFM ALL 2009; Tong i dr. 2014). Iako se terapijsko praćenje koncentracije lijeka primarno koristi za otkrivanje postojanja tihe inaktivacije i procjene potrebe zamjene lijeka, sve više se upotrebljava i za prilagodbu doze lijeka (AIEOP-BFM ALL 2009; Tong i dr. 2014).

### 3.2.6. Ostali neželjeni štetni učinci

Uz alergijsku reakciju kao najčešći neželjeni štetni učinak, ostali značajni štetni učinci su pankreatitis, tromboembolija, hiperglikemija, poremećaj rada jetre, komplikacije u središnjem živčanom sustavu te pojava sekundarnih novotvorina. Neposredno nakon primjene lijeka kod 50% do 60% pacijenata javljaju se vrućica, zimica, mučnina i povraćanje.

Pankreatitis povezan s upotrebom I – asparaginaze javlja se kod 5% do 10% pacijenata (Avramis i dr. 2002; Vrooman i dr. 2010; Moghrabi i dr. 2007; Silverman i dr. 2001), najčešće unutar 2 dana do 44 dana nakon primjene lijeka (Alvarez & Zimmerman 2000; Wu i dr. 2008; Garrington i dr. 1998; Knoderer i dr. 2007). Klinička slika je veoma raznolika, od blagog povišenja amilaza i lipaza do životno ugrožavajućih komplikacija poput insuficijencije gušterače, stvaranja pseudocista i krvarenja, sa stopom smrtnosti od 21% (Sahu i dr. 1998). Nije pronađena povezanost između upotrebene doze, trajanja liječenja ili vrste korištenog pripravka s razvojem pankreatitisa (Sahu i dr. 1998; Knoderer i dr. 2007). Rizični čimbenici koji se povezuju s nastankom pankreatitisa su dob djece iznad 9 godina i prateća terapija antraciklinskim kemoterapeutima i prednizonom, dok je rizik bio smanjen za one koji su primali deksametazon (Silverman i dr. 2001; Knoderer i dr. 2007).

Učestalost venske tromboembolije (duboka venska tromboza i plućna embolija) kod djece s tumorom iznosi čak 10%, rizik je veći kod djece starije od 10 godina i one koja boluju od ALL – a u usporedbi s drugim tumorima (Athale i dr. 2008). Incidencija tromboembolije kod djece s ALL – om kreće se između 1,1% i 36,7%, u prosjeku iznosi 3,2% (Athale & Chan 2003; Payne & Vora 2007). Liječenje I – asparaginazom jedan je od najvećih rizičnih čimbenika za nastanak venske tromboembolije kod djece s ALL – om, zbog utjecaja na proizvodnju faktora zgrušavanja krvi, kao i zbog istodobne primjene s kortikosteroidima (Athale & Chan 2003). Pod većim rizikom za razvoj tromboembolije su djeca u dobi od 11 do 16 godina u usporedbi s mlađom djecom (1 - 10 godina) (Appel i dr. 2008). Vrste pripravka asparaginaze ne utječu na rizik razvoja tromboembolijskih komplikacija (Moghrabi i dr. 2007). L – asparaginaza može izazvati produljenje protrombinskog vremena (PV), aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena (APTV) te izazvati hipofibrinogemiju.

Komplikacije liječenja u središnjem živčanom sustavu čine venska tromboembolija (Silverman i dr. 2001) i poremećaji cerebralne funkcije koji uključuju smetenost, somnolenciju, komu, depresiju, letargiju i umor (Larson i dr. 1998; Ohnuma i dr. 1970; Feinberg & Swenson 1988). Pretpostavljeni mehanizam djelovanja je neurotoksičnost aspartične kiseline, glutaminske kiseline i amonijaka (Ohnuma i dr. 1970; Kieslich i dr. 2003). Učestalost je raznolika, neka istraživanja navode poremećaje u središnjem živčanom

sustavu kod 33% djece (Cairo 1982; Oettgen i dr. 1970), dok druga nisu zamijetila nikakve poremećaje (Moghrabi i dr. 2007). Također, kod pacijenata liječenih L – asparaginazom zabilježen je i sindrom stražnje reverzibilne encefalopatije (eng. *Posterior reversible encephalopathy syndrome*, PRES) koji se očituje promjenom mentalnog statusa, glavoboljom, napadajima, povišenjem krvnog tlaka i poremećajima vida. Prilikom sumnje na razvoj PRES - a potrebno je prekinuti terapiju, kontrolirati krvni tlak i promatrati pacijenta radi uočavanja razvoja napadaja.

Hiperglikemija se pojavljuje kod 11% do 19% pacijenata liječenih L – asparaginazom (Oettgen i dr. 1970a; Ohnuma i dr. 1970b). Najčešće se pojavljuje za vrijeme indukcije i reindukcije kada se zajedno primjenjuju L – asparaginaza i kortikosteroidi te nestaje unutar 2 do 4 tjedna (Pui i dr. 1981). Primijećeni su i slučajevi dijabetičke ketoacidoze te je potrebno pratiti razinu glukoze u krvi.

Poremećaji jetrene funkcije očituju se povišenom razinom bilirubina, alkalne fosfataze, alanin aminotransferaze i aspartat aminotransferaze te se nalaze kod gotovo svih pacijenata koji su primali L – asparaginazu (Oettgen i dr. 1970; Ohnuma i dr.1970). Vraćaju se na normalne vrijednosti 2 do 3 tjedna nakon završetka liječenja (Pratt & Johnson 1971; Biggs i dr. 1971). Prema Prattu i Johnsonu mikrovaskularna i makrovaskularna steatoza mogu se razviti kod do 87% pacijenata i mogu trajati i do 8 mjeseci nakon završetka liječenja L – asparaginazom (Pratt & Johnson 1971). Povećana proizvodnja amonijaka može dovesti do hiperamonijemije te je potrebno voditi računa o znakovima metaboličke encefalopatije (konfuzija, stupor, koma).

Primijećena je i češća pojava sekundarne akutne mijeloične leukemije kod pacijenata koji su primali L – asparaginazu u odnose na pacijente koji je nisu primali (Pui i dr., 1995).

### **3.2.7. Interakcije s drugim lijekovima**

L – asparaginaza povećava serumsku koncentraciju deksametazona, što je posljedica smanjenja jetrenih enzima odgovornih za metabolizam deksametazona (Bostrom i dr. 2003). Prilikom primjene PEG – L – asparaginaze potrebno je izbjegavati istovremenu primjenu natalizumaba, pimekrolimusa, takrolimusa i tofacitiniba jer mogu pojačati neželjene štetne učinke lijeka. Izbjegava se i primjena živih cjepiva jer PEG – L – asparaginaza pojačava štetne učinke cjepiva i smanjuje učinak cjepiva.

Kontraindikacije za primjenu native I - asparaginaze su poznata preosjetljivost na pripravke dobivene iz *E.coli* ili bilo koji sastojak pripravka, jetrena insuficijencija, pankreatitis, trudnoća, dojenje, nedavno cijepljenje protiv žute groznice i istovremena primjena s fenitoinom. Kontraindikacije za primjenu PEG – I – asparaginaze su prethodna alergijska reakcija na isti pripravak i anamnestički podaci o trombozi, pankreatitisu ili ozbiljnom krvarenju povezanim s prethodnim davanjem lijeka.

#### **4. CILJEVI RADA**

Cilj ovog rada je ispitati preživljenje djece oboljele od ALL-a te uspješnost liječenja djece različitih skupina rizika. Osnovni cilj ovog rada je pokušati dokazati da alergija na lijek l - asparaginazu utječe na konačni ishod liječenja.

##### **4.1. Pretpostavka**

Djeca s alergijskom reakcijom na l – asparaginazu imaju lošije preživljenje u odnosu na djecu koja nisu razvila alergijsku reakciju.

## **5. ISPITANICI I METODE**

### **5.1. Ispitanici**

U ovom radu retrospektivnom analizom obuhvaćena su djeca koja su oboljela od akutne limfoblastične leukemije, a liječena su na Zavodu za hematologiju i onkologiju Klinike za pedijatriju KBC - a Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u vremenskom razdoblju od 1. studenog 2002. do 31. listopada 2011. godine. Ispitivana skupina sastojala se od 123 djece liječenih prema protokolu "ALL IC – BFM 2002".

### **5.2. Metode**

Prikupljeni su podaci iz medicinske dokumentacije o dobi, spolu, skupini rizika, razvoju alergijske reakcije, vremenu razvoja alergijske reakcije, zamjenskoj terapiji i ishodu liječenja. U statističkoj obradi prikupljenih podataka i dobivenih rezultata korištene su prikladne metode deskriptivne statistike: medijan, aritmetička sredina, standardna devijacija, raspon te najmanja i najveća vrijednost.

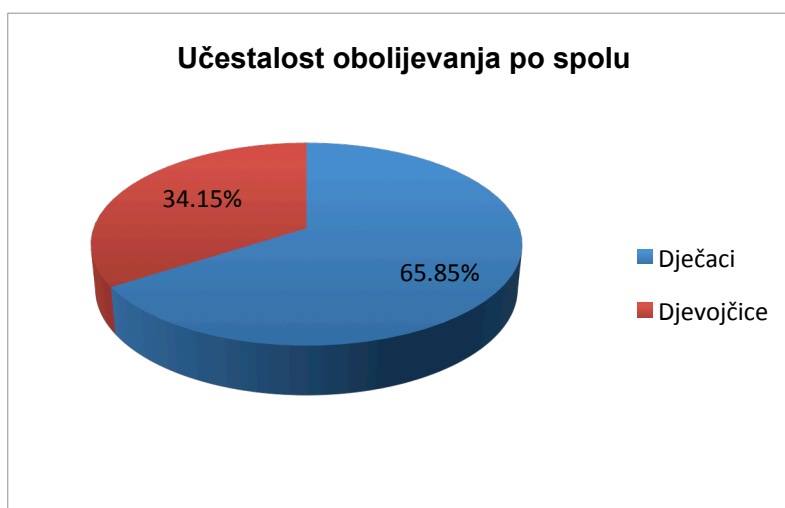
Rezultati kvantitativne analize podataka interpretirani su na 5%-tnoj razini značajnosti, a značajnom je smatrana svaka razlika na razini  $p < 0,05$ . Prikupljeni podaci analizirani su uz pomoć programske podrške STATISTICA 11, StatSoft, Inc. Raspodjele frekvencija numeričkih i kvalitativnih varijabli prikazane su grafički i tablično. Za analizu preživljenja korištena je metoda Kaplan – Meier. Razlika u vjerojatnosti preživljenja između skupina analizirana je log - rank testom.

## 6. REZULTATI

Od ukupno 123 ispitanika koji su sudjelovali u ovom retrospektivnom istraživanju, alergijsku reakciju na I – asparaginazu razvilo je 41 dijete (33,33%) (Tablica 1.). Među ispitanicima bile su 42 djevojčice (34,15 %) i 81 dječak (65,85%) (Slika 1.). Prosječna dob pri postavljanju dijagnoze je 6 godina i 9 mjeseci (6,72 godine), najranija postavljena dijagnoza je u dobi od 1 godine i 4 mjeseca (1,37 godine), a najkasnija sa 16 godina i 3 mjeseca (16,25 godina). Medijan postavljanja dijagnoze je 5 godina i 4 mjeseca (5,3 godine).

**Tablica 1. Broj alergičnih pacijenata, broj umrlih**

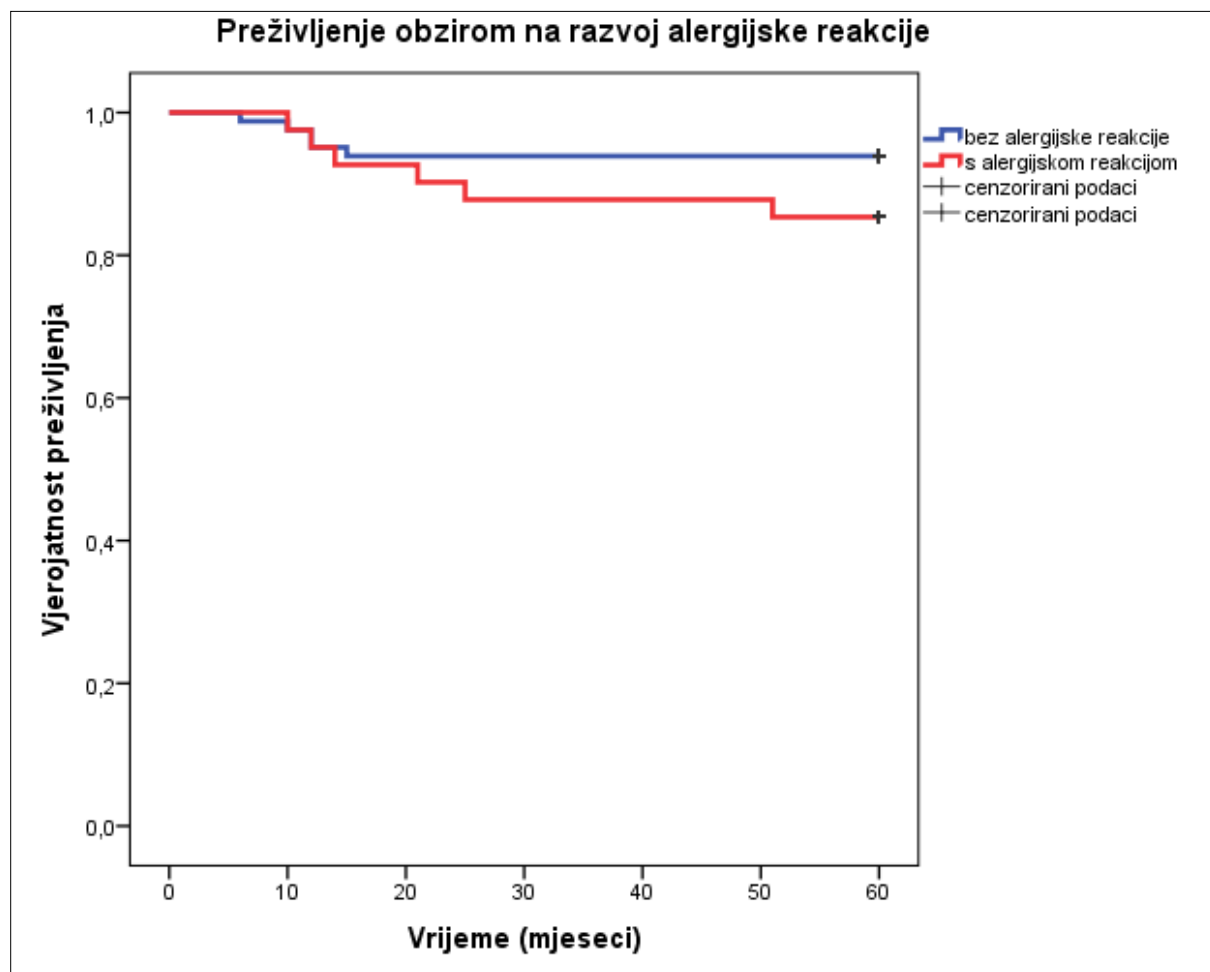
PACIJENTI	BROJ OBOLJELIH n(%)	BROJ UMRЛИH n(%)
Bez alergije	82 (66,67%)	5 (45,45%)
S alergijom	41 (33,33%)	6 (54,55%)
Ukupno	123 (100%)	11 (100%)



**Slika 1. Učestalost obolijevanja po spolu**

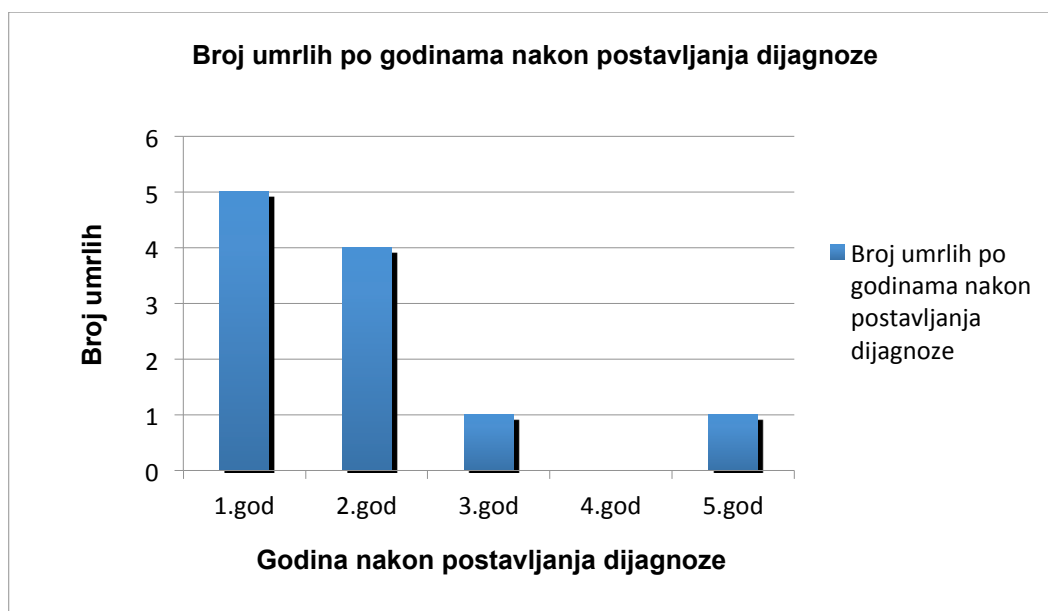


Ukupno preživljenje pacijenata iznosi 91,1%. Prosječno vrijeme preživljenja nakon postavljanja dijagnoze iznosi  $56,16 \pm 1,15$  mjeseci (95%CI = 53,9 - 58,4), za pacijente bez alergijske reakcije  $57,01 \pm 1,3$  mjeseca (95%CI = 54,5 - 59,6), a za one s alergijskom reakcijom  $54,46 \pm 2,25$  mjeseca (95%CI = 50,1 – 58,7). Nema statistički značajne razlike u preživljenju pacijenata bez alergijske reakcije od onih s alergijskom reakcijom (93,9% nasuprot 85,4%,  $p=0,129$ ) (Slika 2.).



**Slika 2. Preživljenje pacijenata obzirom na razvoj alergijske reakcije**

Broj umrlih pacijenata po godini u kojoj je smrt nastupila nakon postavljanja dijagnoze prikazan je na slici 3. Ukupno je umrlo 11 djece, od toga 6 koji su razvili alergiju na I – asparaginu i 5 koji nisu (Tablica 1.). Prosječno vrijeme od postavljanja dijagnoze do smrti je 1 godina i 5 mjeseci (1,43 godine). Najranija smrt nastupila je nakon 7 mjeseci (0,56 godina), a najkasnija nakon 4 godine i 2 mjeseca (4,18 godina).



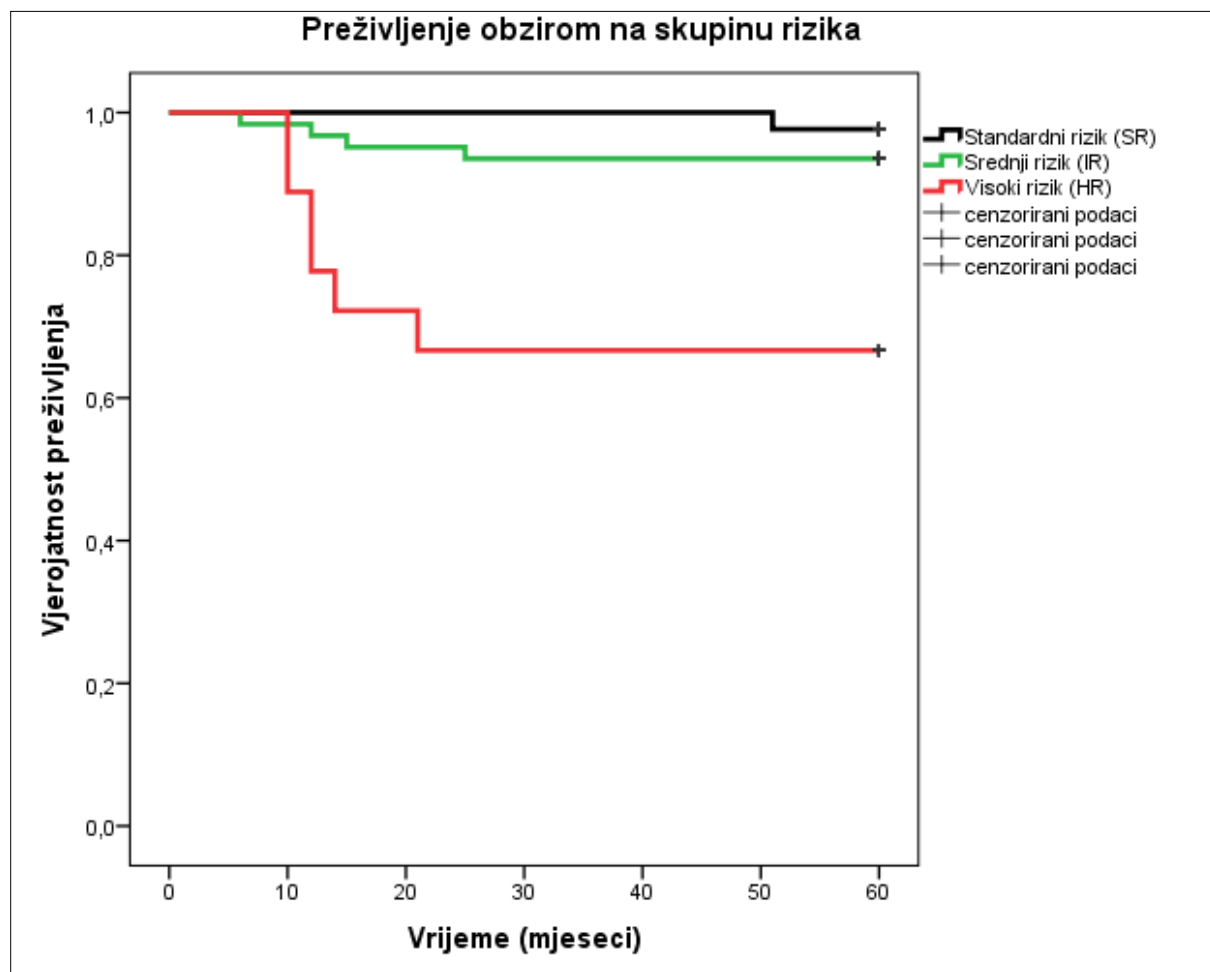
**Slika 3. Broj umrlih po godinama nakon postavljanja dijagnoze**

U tablici 2. prikazana je raspodjela pacijenata po skupinama rizika. Pacijenti standardnog rizika (eng. SR – *standard risk*) čine 34,96%, u skupini srednjeg rizika (eng. IR – *intermediate risk*) nalazi se 50,41% pacijenata, a u skupini visokog rizika (eng. HR – *high risk*) 14,63% pacijenata.

**Tablica 2. Raspodjela pacijenata po skupinama rizika**

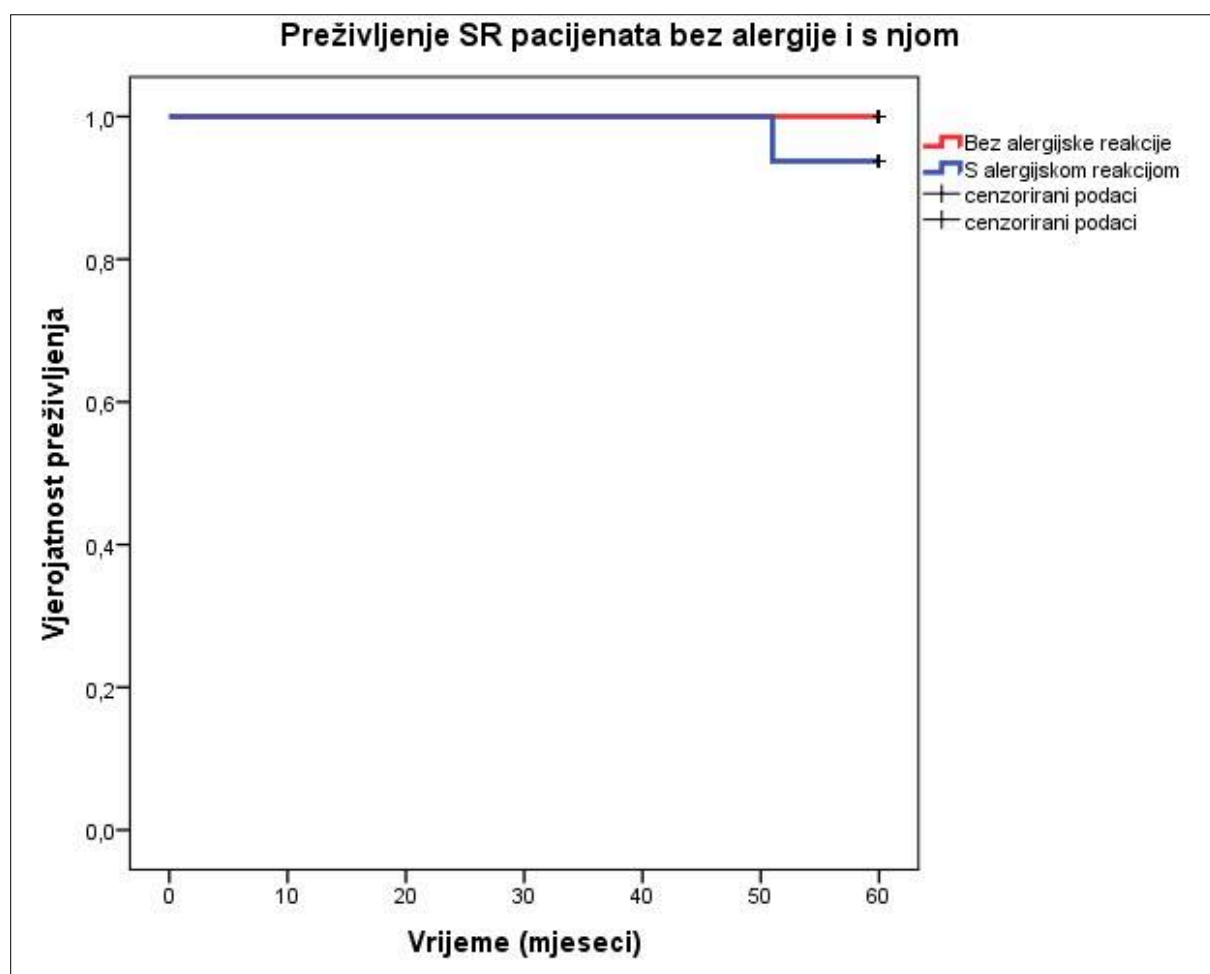
PACIJENTI	SR n (%)	IR n (%)	HR n (%)
Bez alergije	27 (62,79%)	44 (70,97%)	11 (61,11%)
S alergijom	16 (37,21%)	18 (29,03%)	7 (38,89%)
Ukupno	43 (100%)	62 (100%)	18 (100%)

Na slici 4. prikazano je preživljenje pacijenata po skupinama rizika, vidljivo je da skupina standardnog rizika ima preživljenje 97,7%, skupina srednjeg rizika 93,5%, a skupina visokog rizika 66,7% ( $p < 0,001$ ). Prosječno vrijeme preživljenja pacijenata standardnog rizika iznosi  $59,79 \pm 0,21$  mjeseci (95% CI = 59,4 – 60,2), pacijenata srednjeg rizika  $57,07 \pm 1,44$  mjeseci (95% CI = 54,2 – 59,9), a pacijenata visokog rizika  $44,39 \pm 5,23$  mjeseci (95% CI = 34,1 – 54,6).



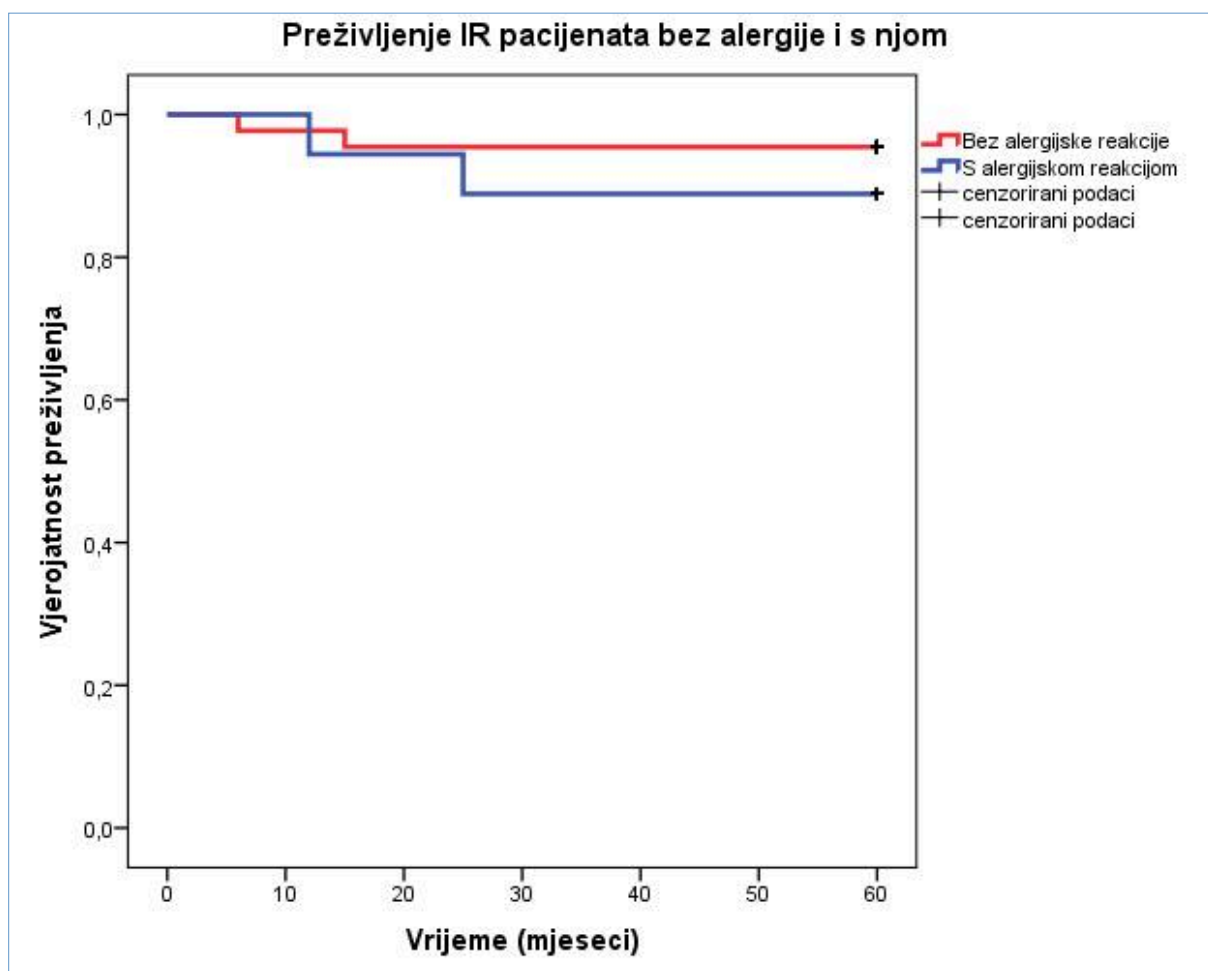
**Slika 4. Preživljenje obzirom na skupinu rizika**

Na slici 5. prikazano je preživljenje pacijenata standardnog rizika bez alergije na l – asparaginazu i s alergijom. Iz Kaplan – Meierovih krivulja vidljivo je da je preživljenje pacijenata standardnog rizika bez alergije 100%, a s alergijom 93,8% ( $5,00 \pm 0,00$  godina nasuprot  $4,95 \pm 0,20$  godina). Razlika u preživljenju SR pacijenata bez alergije na l – asparaginazu i s alergijom nije statistički značajna ( $p=0,194$ ).



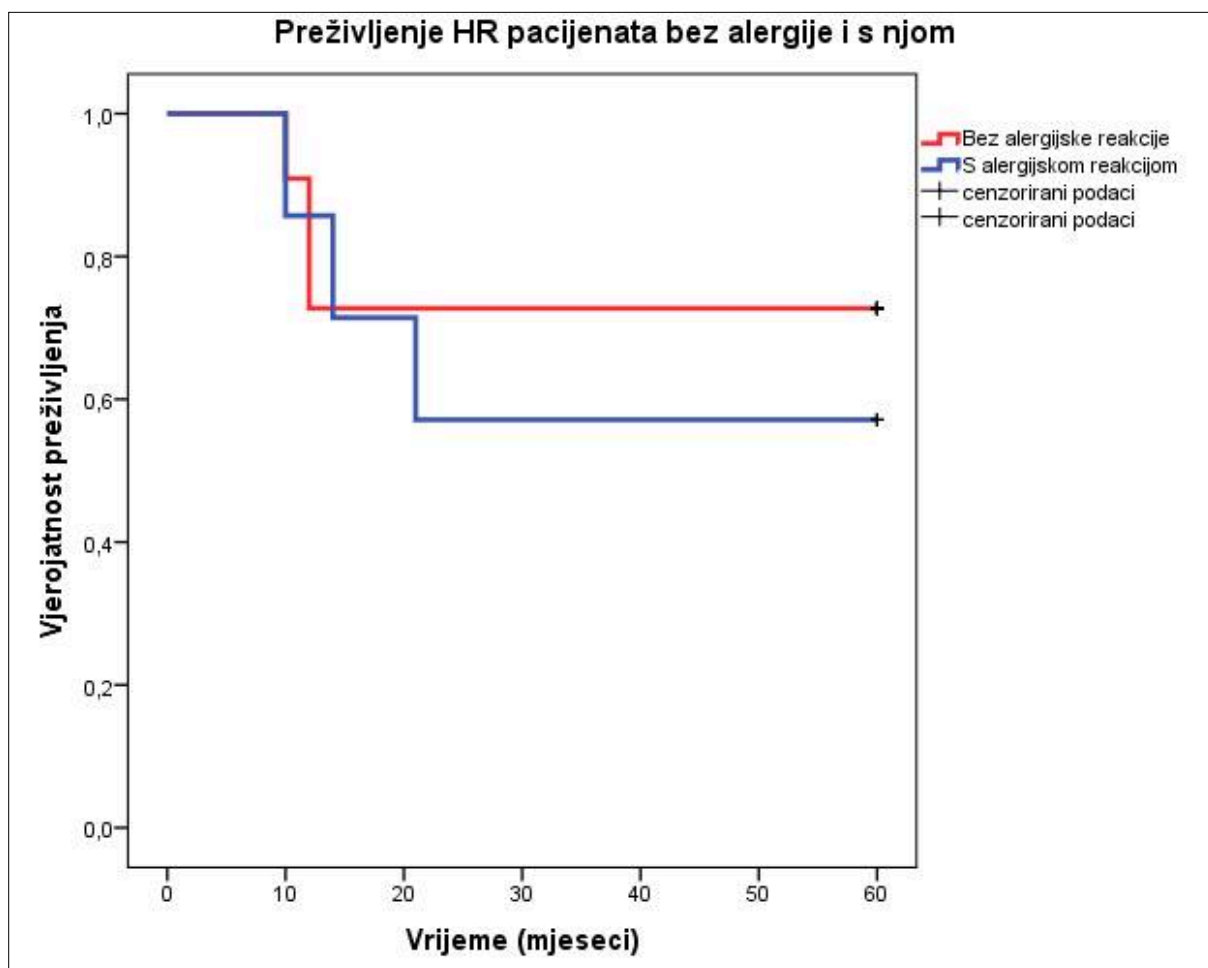
**Slika 5. Preživljenje SR pacijenata bez alergije i s njom**

Slika 6. prikazuje Kaplan – Meierove krivulje preživljenja pacijenata srednjeg rizika s alergijom i bez nje. Pacijenti bez alergijske reakcije na I – asparaginu imaju preživljenje 95,5%, dok oni s alergijskom reakcijom imaju preživljenje 88,9% ( $4,82 \pm 0,87$  godina nasuprot  $4,62 \pm 1,13$  godina); razlika u preživljenju nije statistički značajna ( $p=0,352$ ).



**Slika 6. Preživljenje IR pacijenata bez alergije i s njom**

Slika 7. prikazuje Kaplan – Meierove krivulje preživljenja pacijenata visokog rizika s alergijom i bez nje. Preživljenje pacijenata s alergijskom reakcijom iznosi 57,1%, dok je preživljenje pacijenata bez alergijske reakcije 72,7% ( $3,72 \pm 2,45$  godine nasuprot  $3,9 \pm 1,88$  godina), bez statistički značajne razlike u preživljenju ( $p=0,573$ ).

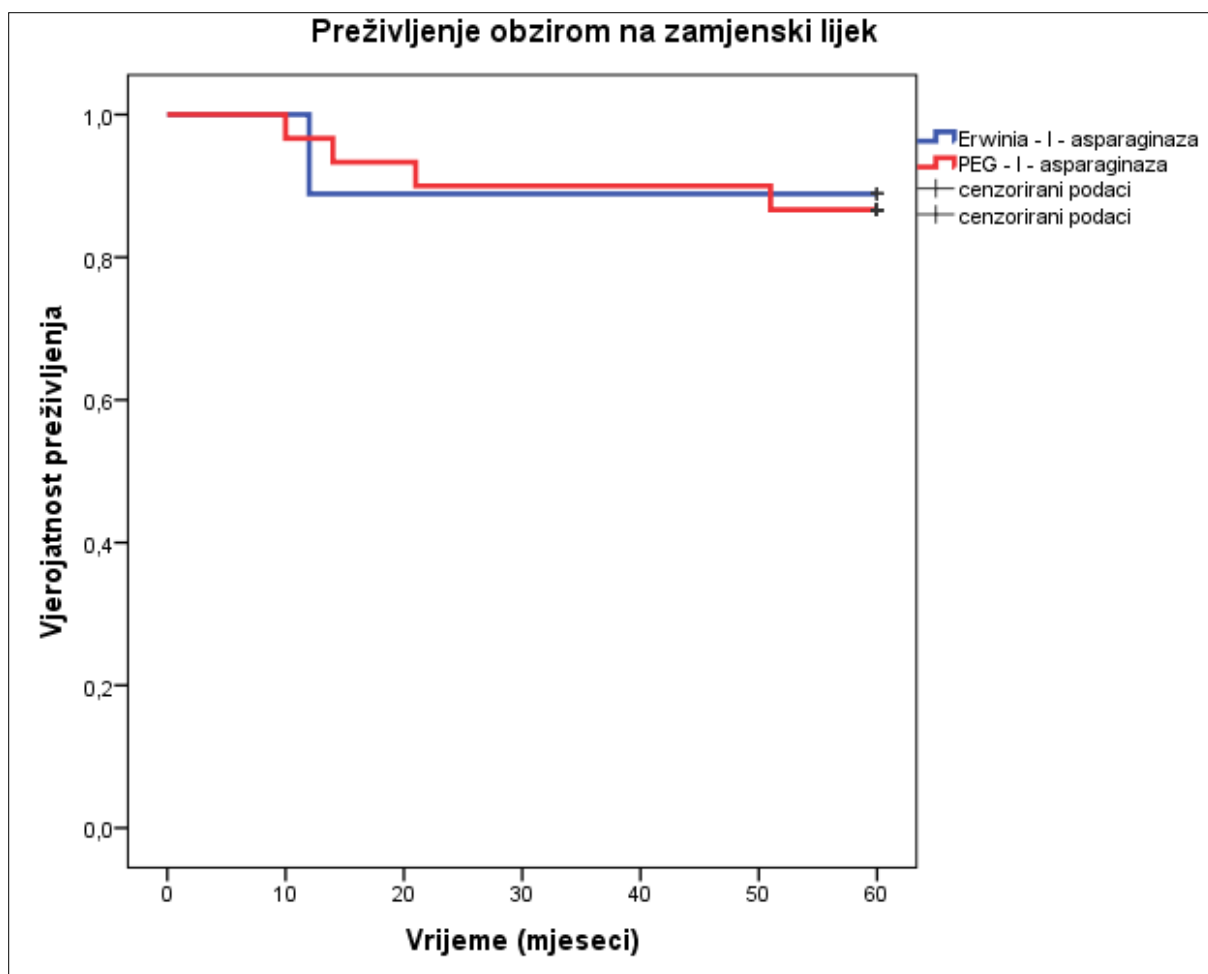


**Slika 7. Preživljenje HR pacijenata bez alergije i s njom**

Nakon razvoja alergije na nativnu I – asparaginazu pacijenti su primili jedan od druga dva pripravka asparaginaze, PEG – I - asparaginazu ili *Erwinia* I - asparaginazu. PEG – I - asparaginazu je primilo 30 pacijenata, a *Erwinia* I - asparaginazu 9. Dva pacijenta nisu primila zamjenski lijek (Tablica 3.). Slika 8. prikazuje Kaplan – Meierove krivulje preživljenja za pacijente na zamjenskim lijekovima. Pacijenti koji nisu primili zamjensku terapiju nisu uključeni u statističku analizu preživljenja Kaplan – Meier. Iz krivulja je vidljivo da pacijenti koji su primali PEG – I - asparaginazu imaju preživljenje 86,7%, dok oni koji su primali *Erwinia* I - asparaginazu imaju 88,9%; razlika u preživljenju nije statistički značajna ( $p=0,385$ ). Prosječno vrijeme preživljenja pacijenata koji su primali PEG – I – asparaginazu iznosi  $55,2 \pm 2,48$  mjeseci (95% CI = 50,3 – 60,1), dok su pacijenti na *Erwinia* I – asparaginazi imali prosječno vrijeme preživljenja  $54,67 \pm 5,03$  mjeseci (95% CI = 44,8 – 64,5).

**Tablica 3. Zamjenska terapija**

LIJEK	BROJ PACIJENATA n(%)	UMRLI n(%)
PEG – I - asparaginaza	30 (73,17%)	4 (66,66%)
<i>Erwinia</i> I - asparaginaza	9 (21,95%)	1 (16,67%)
Bez zamjenske terapije	2 (4,88%)	1 (16,67%)
Ukupno	41 (100%)	6 (100%)



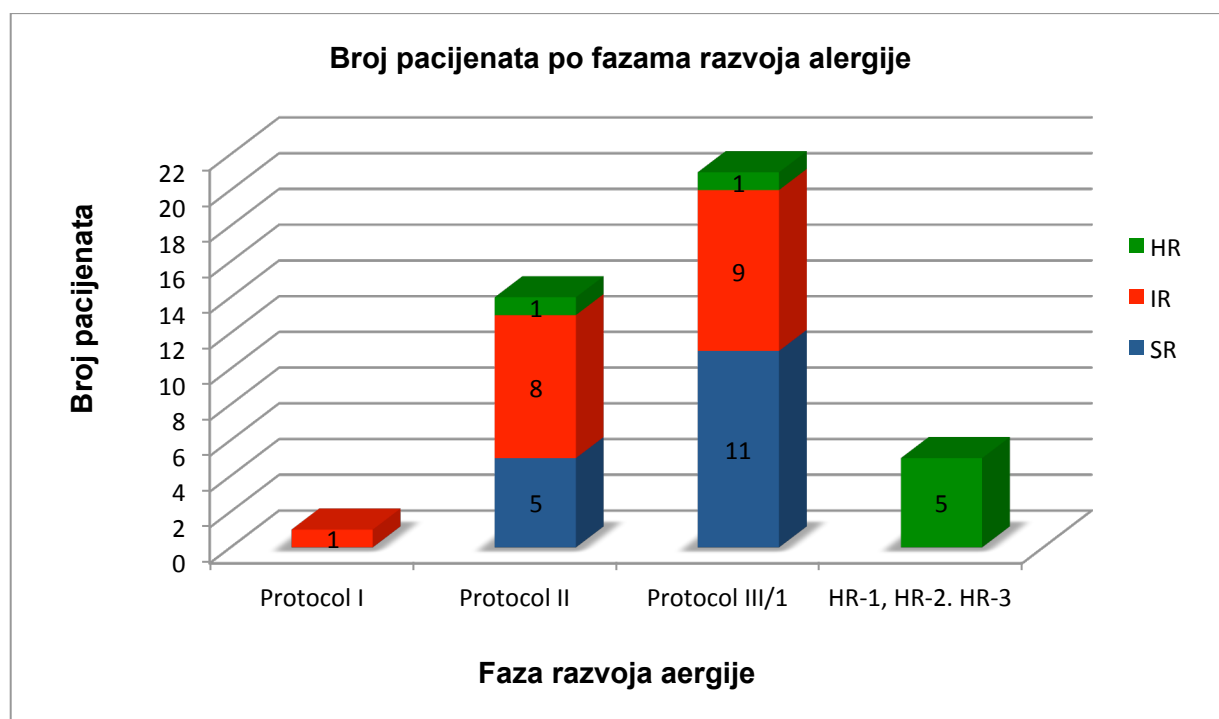
**Slika 8. Preživljenje obzirom na zamjenski lijek**

Najviše pacijenata razvilo je alergiju u fazi liječenja Protocol III/1 (21 pacijent), zatim u fazi Protocol II (14 pacijenata). U fazi Protocol HR – 1 alergiju su razvila 3 HR pacijenta te po jedan pacijent u fazama Protocol I, Protocol HR – 2 i Protocol HR – 3 (Slika 9.) (Tablica 4.). Petoro pacijenata su u kasnijim fazama liječenja razvili alergijsku reakciju i na zamjenski lijek, svih 5 su primali PEG – I - asparaginazu. Nakon razvoja alergije 2 pacijenta su kao zamjenu primala *Erwinia* I - asparaginazu, a 3 nisu primala zamjenski lijek.



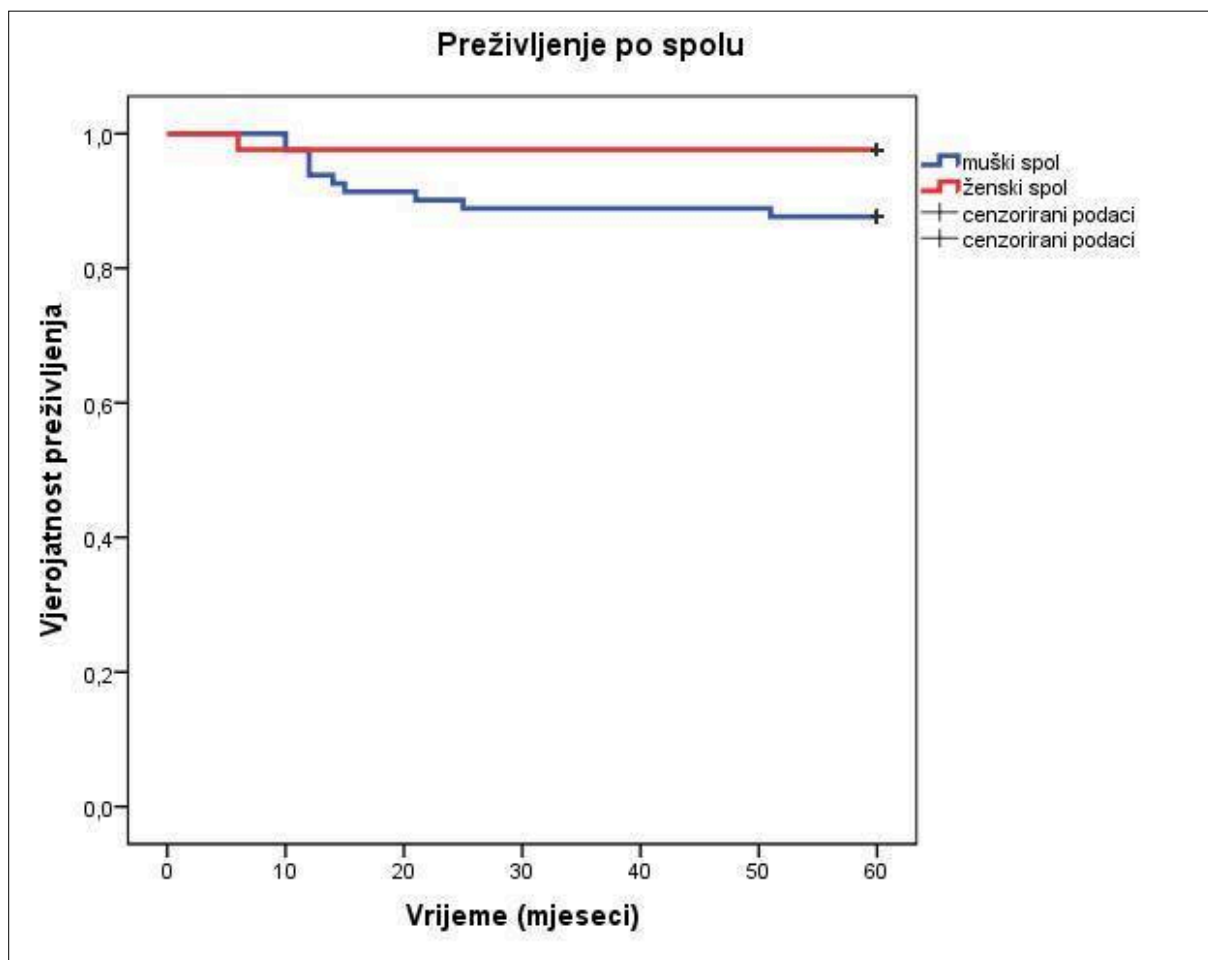
**Tablica 4. Raspodjela pacijenata po fazama razvoja alergije i skupinama rizika**

Faza	Skupina rizika		
	SR n(%)	IR n(%)	HR n(%)
Protocol I	0 (%)	1 (5,56%)	0 (0%)
Protocol II	5 (31,25%)	8 (44,44%)	1 (14,29%)
Protocol III/1	11 (68,75%)	9 (50,0%)	1 (14,29%)
HR – 1, HR – 2 , HR – 3	0 (0%)	0 (0%)	5 (71,42%)
Ukupno	16 (100%)	18 (100%)	7 (100%)



**Slika 9. Broj pacijenata po fazama razvoja alergijske reakcije**

Slika 10. prikazuje Kaplan – Meierove krivulje preživljenja za dječake i djevojčice iz kojih se vidi da je preživljenje dječaka 87,7%, a djevojčica 97,6% ( $p=0,073$ ). Prosječno vrijeme preživljenja dječaka iznosi  $54,84 \pm 1,6$  mjeseci (95% CI = 51,7 – 57,9), a prosječno vrijeme preživljenja djevojčica iznosi  $58,71 \pm 1,27$  mjeseci (95% CI = 56,2 – 61,2).

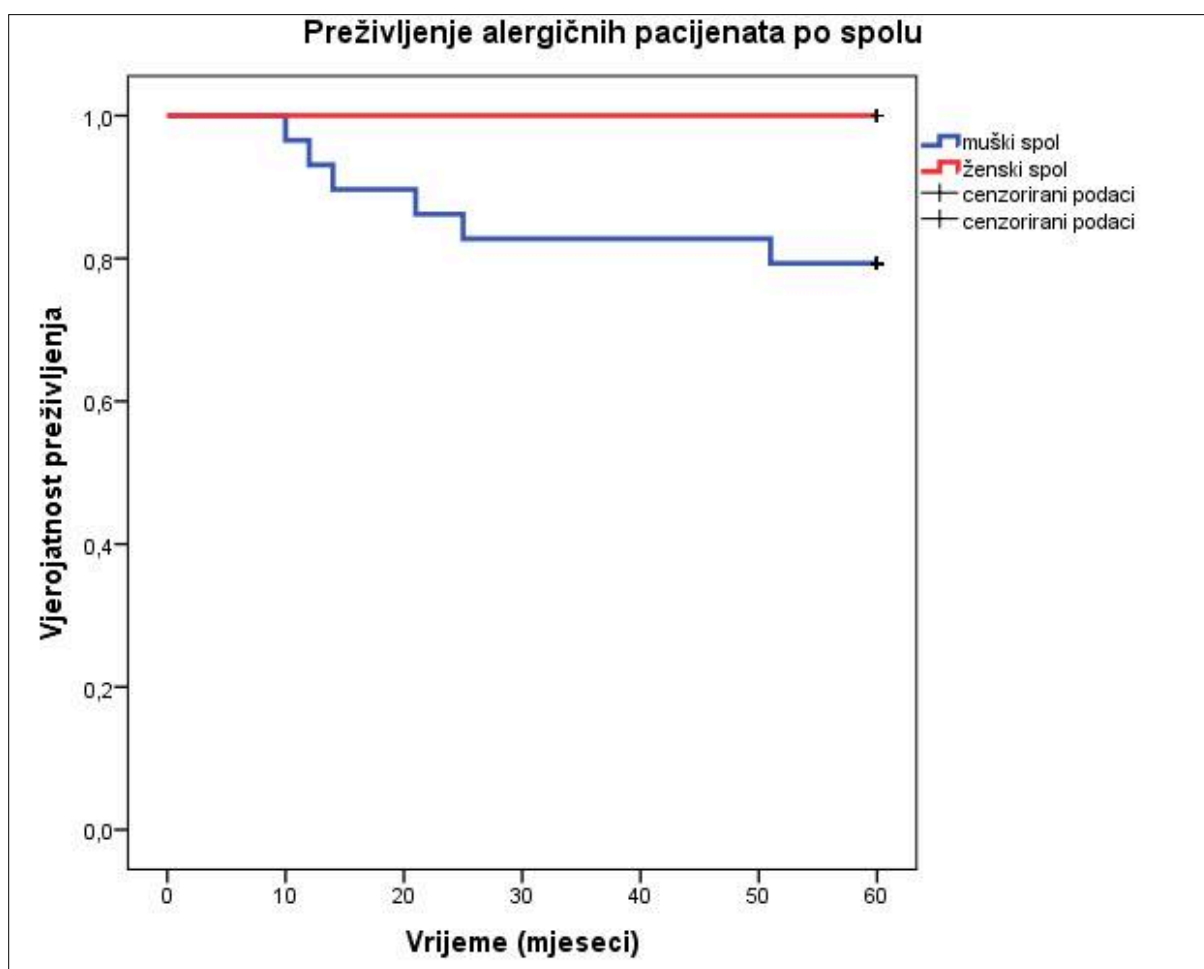


Slika 10. Preživljenje pacijenata po spolu

Među onima koji su razvili alergijsku reakciju bilo je 29 dječaka (70,73%) i 12 djevojčica (29,27%) (Tablica 5.). Preživljenje dječaka s alergijskom reakcijom iznosi 79,3%, dok je preživljenje djevojčica s alergijskom reakcijom 100% ( $4,35 \pm 1,4$  godine nasuprot  $5,00 \pm 0,00$  godina); razlika u preživljenju nije statistički značajna ( $p=0,099$ ) (Slika 11.).

**Tablica 5. Raspodjela alergije po spolu**

SPOL	BROJ PACIJENATA n(%)	UMRLI n(%)
Muško	29 (70,73%)	6 (100%)
Žensko	12 (29,27%)	0 (0%)
Ukupno	41 (100%)	6 (100%)



**Slika 11. Preživljenje alergičnih pacijenata po spolu**

## 7. RASPRAVA

U ovom radu pokušali smo retrospektivnom analizom dokazati da djeca oboljela od ALL - a, a koja su liječena standardiziranim protokolom ALL IC - BFM 2002, u slučaju alergije na lijek L - asparaginazu imaju lošiji ishod liječenja. ALL je bolest koja se modernim polikemoterapijskim protokolima može liječiti kod preko 80% oboljelih. Bitan napredak u liječenju ove bolesti je bilo uvođenje lijeka L - asparaginaze početkom 70 - ih godina prošlog stoljeća. Ovaj lijek nedvojbeno povećava stopu izlječenja od ALL - a, ali je njegova uporaba istodobno povezana s čitavim nizom neželjenih djelovanja. Najčešće se u literaturi opisuju alergija na L - asparaginazu te stvaranje protutijela na taj lijek. L - asparaginaza može se izolirati iz različitih bakterijskih, gljivičnih i biljnih stanica. Najčešće se koriste bakterijski izvori zbog jednostavne kultivacije, koji su međutim najčešći uzrok neželjenih štetnih učinaka (Soniya i dr. 2011). Dvije glavne metode dobivanja su uzgoj na čvrstoj podlozi od rižinih mekinja (eng. *solid state fermentation* – SSF) i na vlažnoj podlozi s hranjivim tvarima (eng. *submerged fermentation* - SF) (Lonsane i dr. 1985). Djelotvornija metoda je kultivacija na čvrstoj podlozi zbog veće proizvodnje enzima i jednostavnije tehnike (Datar 1986). Osim alergije na L - asparaginazu brojni su drugi neželjeni učinci, prvenstveno na sintetsku funkciju jetre, zbog čega dolazi do smanjene sinteze proteina koji sudjeluju u sustavu zgrušavanja krvi. Zbog navedenog, djeca oboljela od ALL - a za vrijeme istodobnog primanja L - asparaginaze i kortikosteroida sklona su s jedne strane trombozama, a s druge strane krvarenjima radi nedostatka antitrombina III te smanjene sinteze fibrinogena i čimbenika zgrušavanja ovisnih o sintetskoj funkciji jetre. Od ukupno 123 ispitanika alergiju na L - asparaginazu razvilo je 41 dijete (33,33%). Iz literature je vidljivo da su sličnu učestalost primijetile i druge skupine. Billet i sur. s Dana – Farber Cancer Institute (DFCI) zabilježili su alergijsku reakciju na L – asparaginazu u 24,8% pacijenata (Billett i dr. 1992), dok su Woo i sur. sa St. Jude Children's Research Hospital (SJCRH) istu primijetili u 32,5% slučajeva (Woo i dr. 2000). Kod pacijenata liječenih po ALL – BFM 95 protokolu Müller i sur. navode alergijsku reakciju u 24% pacijenata (Müller i dr. 2001). Navedeni rezultat se podudara s literaturnim podacima. I u našem radu dobivena je nešto veća učestalost ALL - a kod dječaka nego kod djevojčica te najčešća prosječna dob od oko 5 – 6 godina. Pacijenti su podijeljeni na 3 skupine rizika ovisno o tome kakvi su im bili početni rizični čimbenici i kakav im je bio uspjeh uvodne terapije. U skupini standardnog rizika nalazi se 34,96% pacijenata, u skupini srednjeg rizika 50,41%, a u skupini visokog rizika 14,63% pacijenata. Ovakva raspodjela podudara se s raspodjelom pacijenata u ALL IC - BFM 2002 Study Group, gdje su SR pacijenti činili 30,91% pacijenata, IR pacijenti 52,37% i HR pacijenti 16,72% (Stary i dr. 2013). Ukupno 60 - mjesečno preživljenje iznosi 91,1%, a ako raščlanimo pacijente u dvije

skupine tada vidimo da pacijenti koji nisu imali alergiju na I - asparaginazu imaju preživljenje 93,9%, a oni koji su imali alergiju imaju preživljenje od 85,4%. Iako je navedena razlika očita, statističkim metodama nismo uspjeli dokazati jasnu statističku razliku između te dvije skupine bolesnika. Studija provedena na *Pediatric Oncology Group* (POG) dokazala je da alergijska reakcija na I – asparaginazu ne utječe na preživljenje djece s ALL – om (Wacker i dr. 2007). Rezultati studijske grupe *St. Jude Children's Research Hospital* također su pokazali da alergija na I – asparaginazu ne utječe na ishod liječenja djece s ALL – om (Woo i dr. 1999), kao i studija grupe *Dana – Farber Cancer Institute* (Silverman i dr. 2001). Izostanak povezanosti alergijske reakcije na I – asparaginazu i nepovoljnijeg ishoda dokazali su i Larson i sur. (Larson i dr. 1998). Skupina standardnog rizika ima preživljenje 97,7%, a skupina srednjeg rizika 93,5%, što je značajno bolje od preživljenja visokorizične skupine koje iznosi 66,7%. Preživljenje HR pacijenata u *ALL IC - BFM 2002 Study Group* (ALL IC – BFM 2002) iznosilo je 62% (Stary i dr. 2013), dok je bolji ishod zabilježila *Nordic Society of Paediatric Haematology and Oncology* (NOPHO – 1992) s devetogodišnjem preživljenjem od 74%, koristeći intenzivne polikemoterapijske protokole s ograničenjem upotrebe zračenja mozga (Saarinen-Pihkala i dr. 2004). Značajan napredak u liječenju visokorizičnih pacijenata postigla je *Children's Cancer Group* (CCG – 1961) uvođenjem postindukcijske intenzifikacije jačeg intenziteta gdje je petogodišnje preživljenje za pacijente s brzim ranim odgovorom na prednizon (eng. *rapid early responders* – RER) iznosilo 81,7% (Seibel i dr. 2008). Dokazali su da postindukcijska intenzifikacija jačeg intenziteta dovodi do značajnije boljeg ishoda u odnosu na postindukcijsku intenzifikaciju dužeg trajanja (81,2% nasuprot 71,7%) (Seibel i dr. 2008). Poboljšanje je vidljivo i u odnosu na prethodnu studiju te grupe (CCG – 1882) koja je imala petogodišnje preživljenje 72,7%. Iz navedenog je vidljivo da su potrebni napor i inovacije protokola liječenja kojim bismo poboljšali preživljenje i visokorizične skupine. Među najveće izazove za postizanje boljeg ishoda visokorizičnih pacijenata spada razvitak metoda za rano otkrivanje pacijenata koji imaju veću šansu za slabiji odgovor na liječenje (Rabin 2012). Raščlambom djece u skupini standardnog rizika i djece u skupini srednjeg rizika koja jesu i nisu imala alergiju, nismo našli statistički značajne razlike. Analizom preživljenja skupine djece visokog rizika koja jesu i one koja nisu imala alergiju na I - asparaginazu vidljiva je razlika. Tako oni s alergijskom reakcijom preživljavaju u 57,1%, a oni bez alergijske reakcije u 72,7% slučajeva. Iako je jasna razlika u preživljenju s i bez alergije u ovoj skupini pacijenata, zbog nedovoljnog broja pacijenata u ovom radu nismo uspjeli dokazati zamjetnu statističku razliku visokorizične skupine s i bez alergije na I - asparaginazu. U našoj ispitivanoj skupini bolesnika kada bi se javila alergija na I - asparaginazu alternativni lijekovi bili su PEG – I – asparaginaza ili u drugom slučaju *Erwinia* I - asparaginaza. Preživljenje djece koja su primala PEG – I - asparaginazu iznosi 86,7%, a one koja su primala *Erwinia* I - asparaginazu 88,9%. Ta razlika je diskretna i nije statistički značajna. Analizom podataka

došli smo do zaključka da je najviše pacijenata razvilo alergiju u fazi liječenja Protokola III/1, zatim nešto manji broj pacijenata tijekom protokola II, dok su ostali razvili alergiju na I - asparaginazu tijekom HR ciklusa polikemoterapije. Samo je jedan pacijent razvio alergiju već tijekom indukcijske terapije, odnosno tijekom protokola I. Zanimljivo je da je preživljenje djevojčica značajno bolje (97,6%) u odnosu na preživljenje dječaka (87,7%). Ta razlika nije statistički značajna. Schuster i sur. u svom istraživanju sa studijskom grupom *Pediatric Oncology Group* (POG) dokazali su utjecaj spola na preživljenje djece s ALL – om. Nakon dvogodišnjeg praćenja djece starije dobi (10 – 22 godina) i srednjeg broja leukocita ( $10 - 50 \times 10^9 / l$ ) uočili su da dječaci imaju 20% manje preživljenje, a ta razlika se nakon 5 godina povećala na 38%, ukazujući na moguću potrebu intenzivnijeg liječenja dječaka (Shuster i dr. 1998). Studija koju su proveli Lanning i sur. iz *Nordic Society of Paediatric Haematology and Oncology* studijske grupe pokazala je značajnu razliku u preživljenju djevojčica i dječaka visokog rizika (68% nasuprot 31%), dok razlika nije zabilježena u ostalim skupinama rizika (Lanning i dr. 1992). Alergijska reakcija gledajući prema spolu češće se javljala kod dječaka, preživljenje dječaka s alergijom je iznosilo 79,3%, dok su sve djevojčice s alergijom na I - asparaginazu preživjele. Zbog malog broja pacijenata navedena razlika nije statistički značajna.

U konačnici možemo zaključiti da je I - asparaginaza nedvojbeno neophodan lijek za liječenje ALL - a, ali zbog velikog broja nuspojava, prvenstveno u vidu alergijske reakcije, neophodno je u tom slučaju taj lijek zamijeniti drugim. Kako bismo nedvojbeno utvrdili utječe li zamjensko liječenje na konačno preživljenje potrebna je puno veća skupina pacijenata.

## 8. ZAKLJUČCI

Djeca s alergijskom reakcijom na I – asparaginazu nemaju statistički značajno lošiji ishod liječenja od djece bez alergijske reakcije na I – asparaginazu. Raščlambom pacijenata bez alergijske reakcije i s njom po skupinama rizika nismo dobili statistički značajnu razliku u preživljenju. Statistički značajna razlika u preživljenju nije dokazana ni obzirom na primjenu zamjenskih lijekova PEG – I – asparaginaze i *Erwinia* I – asparaginaze. Analizom preživljenja dječaka i djevojčica s alergijskom reakcijom dobiven je rezultat na granici značajnosti, odnosno da dječaci s alergijskom reakcijom imaju lošije petogodišnje preživljenje od djevojčica. Potrebna su daljnja istraživanja da bi se utvrdilo međudjelovanje razine aktivnosti I – asparaginaze, njezinih neželjenih štetnih djelovanja i ishoda liječenja ALL – a kod djece. Posebno važnu ulogu u boljem razumijevanju djelovanja I – asparaginaze imat će upotreba terapijskog praćenja koncentracije lijeka u plazmi bolesnika. Nužno je utvrditi djelotvornost zamjenskih pripravaka I – asparaginaze i njihov utjecaj na ishod liječenja ALL – a, kao i moguće prednosti liječenja pacijenata visokog rizika pripravcima I – asparaginaze.

## **9. ZAHVALE**

Prije svega želim zahvaliti svom mentoru prof. dr. sc. Ernestu Biliću na podršci, savjetima, pristupačnosti, strpljenju i lijepoj riječi prilikom odabira teme i pisanja ovog diplomskog rada.

Želim se zahvaliti i svojoj obitelji, najviše mojim roditeljima za neizmjernu podršku, ljubav i strpljenje kojima su mi pomogli da dođem do kraja fakulteta.

Hvala mom dečku i najbližim prijateljima koji su uvijek tu za mene.



## 10. LITERATURA

1. AIEOP-BFM ALL 2009. (n.d.). *clinicaltrials.gov*. (N. I. NCT01117441, Urednik, M. Bethesda, Producent, & National Library of Medicine (US)) Preuzeto 22. may 2015 iz International collaborative treatment protocol for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia.: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01117441>.
2. Albertsen , B., Jakobsen , P., Schröder , H., Schmiegelow , K., & Carlsen , N. (2001). Pharmacokinetics of Erwinia asparaginase after intravenous and intramuscular administration. *Cancer Chemother Pharmacol* , 48 (1), 77-82.
3. Albertsen , B., Schröder , H., Jakobsen , P., Avramis , V., Müller , H., Schmiegelow , K., i dr. (2002). Antibody formation during intravenous and intramuscular therapy with Erwinia asparaginase. *Med Pediatr Oncol* , 38 (5), 310-316.
4. Albertsen , B., Schröder , H., Jakobsen , P., Müller , H., Carlsen , N., & Schmiegelow , K. (2001). Monitoring of Erwinia asparaginase therapy in childhood ALL in the Nordic countries. *Br J Clin Pharmacol* , 52 (4), 433-437.
5. Alvarez , O., & Zimmerman , G. (2000). Pegaspargase-induced pancreatitis. *Med Pediatr Oncol* , 34 (3), 200-205.
6. Appel , I., den Boer , M., Meijerink , J., Veerman , A., Reniers , N., & Pieters , R. (2006). Up-regulation of asparagine synthetase expression is not linked to the clinical response L-asparaginase in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* , 107 (11), 4244-4249.
7. Appel , I., Kazemier, K., Boos , J., Lanvers , C., Huijmans , J., Veerman , A., i dr. (2008). Pharmacokinetic, pharmacodynamic and intracellular effects of PEG-asparaginase in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia: results from a single agent window study. *Leukemia* , 22 (9), 1665-1679.
8. Asselin , B., Whitin , J., Coppola , D., Rupp , I., Sallan , S., & Cohen , H. (1993). Comparative pharmacokinetic studies of three asparaginase preparations. *J Clin Oncol* , 11 (9), 1780-1786.
9. Asselin, B. (1999). The three asparaginases. Comparative pharmacology and optimal use in childhood leukemia. *Adv Exp Med Biol* , 457, 621-629.
10. Asselin, B., & Rizzari, C. (2015). Asparaginase pharmacokinetics and implications of therapeutic drug monitoring. *Leuk Lymphoma* , 11, 1-8.
11. Athale , U., & Chan , A. (2003). Thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia: part I. Epidemiology of thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Thromb Res* , 111 (3), 125-131.

12. Athale , U., Siciliano , S., Thabane , L., Pai , N., Cox , S., Lathia , A., i dr. (2008). Epidemiology and clinical risk factors predisposing to thromboembolism in children with cancer. *Pediatr Blood Cancer* , 51 (6), 792-797.
13. Avramis , V., & Panosyan , E. (2005). Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of asparaginase formulations: the past, the present and recommendations for the future. *Clin Pharmacokinet* , 44 (4), 367-393.
14. Avramis , V., Avramis , E., Hunter , W., & Long , M. (2009). Immunogenicity of native or pegylated E. coli and Erwinia asparaginases assessed by ELISA and surface plasmon resonance (SPR-biacore) assays of IgG antibodies (Ab) in sera from patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Anticancer Res* , 29 (1), 299-302.
15. Avramis , V., Sencer , S., Periclou , A., Sather , H., Bostrom , B., Cohen , L., i dr. (2002). A randomized comparison of native Escherichia coli asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. *Blood* , 99 (6), 1986-1994.
16. Avramis, V., & Tiwari, P. N. (2006). Asparaginase (native ASNase or pegylated ASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *International Journal of Nanomedicine* , 1 (3), 241-254.
17. Biggs , J., Chesterman , C., & Holliday , J. (1971). L-asparaginase--clinical experience in leukaemia, lymphoma and carcinoma. *Aust N Z J Med* , 1 (1), 1-7.
18. Billett , A., Carls , A., Gelber , R., & Sallan , S. (1992). Allergic reactions to Erwinia asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia who had previous allergic reactions to Escherichia coli asparaginase. *Cancer* , 70 (1), 201-206.
19. Boos, J., Werber, G., Ahlke, E., Schulze-Westhoff , P., Nowak-Göttl , U., Würthwein, G., i dr. (1996). Monitoring of asparaginase activity and asparagine levels in children on different asparaginase preparations. *Eur J Cancer* , 32A (9), 1544-1550.
20. Boranić, M. (2003). Bolesti krvi i krvitvornih organa i solidni tumori dječje dobi. U D. Mardešić, *Pedijatrija* (str. 635-684). Zagreb: Školska knjiga.
21. Bostrom , B., Sensel , M., Sather , H., Gaynon , P., La , M., Johnston , K., i dr. (2003). Dexamethasone versus prednisone and daily oral versus weekly intravenous mercaptopurine for patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. *Blood* , 101 (10), 3809-3817.
22. Broome , J. (1965). Antilymphoma activity of L-asparaginase in vivo: clearance rates of enzyme preparations from guinea pig serum and yeast in relation to their effect on tumor growth. *J Natl Cancer Inst* , 35 (6), 967-974.
23. Broome, J. (1961). Evidence that the L-Asparaginase Activity of Guinea Pig Serum is responsible for its Antilymphoma Effects. *Nature* , 191, 1114-1115.
24. Broome, J. (1963). Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. I. Properties of the L-asparaginase of guinea

- pig serum in relation to those of the antilymphoma substance. *J Exp Med* , 118, 99-120.
25. Cairo , M. (1982). Adverse reactions of L-asparaginase. *Am J Pediatr Hematol Oncol* , 4 (3), 335-339.
  26. Covini , D., Tardito , S., Bussolati , O., Chiarelli , L., Pasquetto , M., Digilio , R., i dr. (2012). Expanding targets for a metabolic therapy of cancer: L-asparaginase. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* , 7 (1), 4-13.
  27. Datar , R. (1986). Economics of primary separation steps in relation to fermentation and genetic engineering. *Process Biochem* , 21, 19-26.
  28. Douer , D., Yampolsky , H., Cohen , L., Watkins , K., Levine , A., Periclou , A., i dr. (2007). Pharmacodynamics and safety of intravenous pegaspargase during remission induction in adults aged 55 years or younger with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. *Blood* , 109 (7), 2744-2750.
  29. Duval , M., Suciu , S., Ferster , A., Rialland , X., Nelken , B., Lutz , P., i dr. (2002). Comparison of Escherichia coli-asparaginase with Erwinia-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial. *Blood* , 99 (8), 2734-2739.
  30. Evans , W., Tsiatis , A., Rivera, G., Murphy , S., Dahl , G., Denison , M., i dr. (1982). Anaphylactoid reactions to Escherichia coli and Erwinia asparaginase in children with leukemia and lymphoma. *Cancer* , 49 (7), 1378-1383.
  31. Feinberg , W., & Swenson , M. (1988). Cerebrovascular complications of L-asparaginase therapy. *Neurology* , 38 (1), 127-133.
  32. Fletcher, B., Kilberg, M., & Aslanian, A. (2001). Asparagine synthetase expression alone is sufficient to induce L-asparaginase resistance in MOLT-4 human leukaemia cells. *Biochem J* , 357, 321-328.
  33. Garrington , T., Bensard , D., Ingram , J., & Silliman , C. (1998). Successful management with octreotide of a child with L-asparaginase induced hemorrhagic pancreatitis. *Med Pediatr Oncol* , 30 (2), 106-109.
  34. Grigoryan , R., Panosyan , E., Seibel , N., Gaynon , P., Avramis , I., & Avramis , V. (2004). Changes of amino acid serum levels in pediatric patients with higher-risk acute lymphoblastic leukemia (CCG-1961). *In Vivo* , 18 (2), 107-112.
  35. Haskell , C., & Canellos , G. (1969). L-asparaginase resistance in human leukemia--asparagine synthetase. *Biochem Pharmacol* , 18 (10), 2578-2580.
  36. Hawkins , D., Park , J., Thomson , B., Felgenhauer, J., Holcenberg , J., Panosyan , E., i dr. (2004). Asparaginase pharmacokinetics after intensive polyethylene glycol-conjugated L-asparaginase therapy for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* , 10 (16), 5335-5341.

37. Ho , D., Yap , H., Brown , N., Benjamin , R., Friereich , E., Blumenschein , G., i dr. (1981). Clinical pharmacology of intramuscularly administered L-asparaginase. *J Clin Pharmacol* , 21 (2), 72-78.
38. Hutson , R., Kitoh , T., Moraga Amador , D., Cosic , S., Schuster , S., & Kilberg , M. (1997). Amino acid control of asparagine synthetase: relation to asparaginase resistance in human leukemia cells. *Am J Physiol* , 272, 1691-1699.
39. Imbach, P. (2011). General Aspects of childhood leukemia. U P. Imbach , T. Kühne , & R. J. Arceci , *Pediatric Oncology* (str. 1-4). Berlin: Springer.
40. International Collaborative Treatment Protocol For Children And Adolescents With Acute Lymphoblastic Leukemia. (n.d.). *clinicaltrials.gov*. Dohvaćeno iz ClinicalTrials.gov.: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01117441>
41. Iwamoto , S., Mihara , K., Downing , J., Pui , C., & Campana , D. (2007). Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparag. *J Clin Invest* , 117 (4), 1049-1057.
42. Kidd, J. (1953). Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum. *J Exp Med* , 98 (6), 565-582.
43. Kieslich , M., Porto , L., Lanfermann , H., Jacobi , G., Schwabe , D., & Böhles , H. (2003). Cerebrovascular complications of L-asparaginase in the therapy of acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* , 25 (6), 484-487.
44. Killander , D., Dohlwitz , A., Engstedt , L., Franzén , S., Gahrton , G., Gullbring , B., i dr. (1976). Hypersensitive reactions and antibody formation during L-asparaginase treatment of children and adults with acute leukemia. *Cancer* , 37 (1), 220-228.
45. Klug Albertsen , B., Schmiegelow , K., Schröder , H., Carlsen , N., Rosthøj , S., Avramis , V., i dr. (2002). Anti-Erwinia asparaginase antibodies during treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia and their relationship to outcome: a case-control study. *Cancer Chemother Pharmacol* , 50 (2), 117-120.
46. Knoderer , H., Robarge , J., & Flockhart , D. (2007). Predicting asparaginase-associated pancreatitis. *Pediatr Blood Cancer* . , 49 (5), 634-639.
47. Lanning , M., Garwicz , S., Hertz , H., Jonmundsson , G., Kreuger , A., Lie , S., i dr. (1992). Superior treatment results in females with high-risk acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Acta Paediatr* , 81 (1), 66-68.
48. Larson , R., Fretzin , M., Dodge , R., & Schiffer , C. (1998). Hypersensitivity reactions to L-asparaginase do not impact on the remission duration of adults with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* , 12 (5), 660-665.
49. Liu , C., Kawedia , J., Cheng , C., Pei , D., Fernandez , C., Cai , X., i dr. (2012). Clinical utility and implications of asparaginase antibodies in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* , 26 (11), 2303-2309.

50. Lonsane, B., Ghildyal, N., Budiatman, S., & Ramakrishna, S. (1985). Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme Microb Technol* , 7, 258-265.
51. Müller , H., Beier , R., da Palma , J., Lanvers , C., Ahlke , E., von Schütz , V., i dr. (2001). PEG-asparaginase (Oncaspar) 2500 U/m(2) BSA in reinduction and relapse treatment in the ALL/NHL-BFM protocols. *Cancer Chemother Pharmacol* , 49 (2), 149-154.
52. Müller , H., Beier , R., Löning , L., Blütters-Sawatzki , R., Dörffel , W., Maass , E., i dr. (2001). Pharmacokinetics of native Escherichia coli asparaginase (Asparaginase medac) and hypersensitivity reactions in ALL-BFM 95 reinduction treatment. *Br J Haematol* , 114 (4), 794-799.
53. Mashburn, L., & Wriston, J. (1964). Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from escherichia coli. *Arch Biochem Biophys* , 105, 450-452.
54. Moghrabi , A., Levy , D., Asselin , B., Barr , R., Clavell , L., Hurwitz , C., i dr. (2007). Results of the Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 95-01 for children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* , 109 (3), 896-904.
55. Muller, H., & Boos, J. (1998). Use of L - asparaginase in childhood ALL. *Crit Rev Oncol Hematol* , 28 (2), 97-113.
56. Nesbit , M., Chard , R., Evans , A., Karon , M., & Hammond , G. (1979). Evaluation of intramuscular versus intravenous administration of L-asparaginase in childhood leukemia. *Am J Pediatr Hematol Oncol* , 1 (1), 9-13.
57. Oettgen , H., Stephenson , P., Schwartz , M., Leeper , R., Tallai, L., Tan , C., i dr. (1970). Toxicity of E. coli L-asparaginase in man. *Cancer* , 25 (2), 253-278.
58. Ohnuma , T., Holland , J., Freeman , A., & Sinks , L. (1970). Biochemical and pharmacological studies with asparaginase in man. *Cancer Res* , 30 (9), 2297-2305.
59. Panetta , J., Gajjar , A., Hijiya , N., Hak , L., Cheng , C., Liu , W., i dr. (2009). Comparison of native E. coli and PEG asparaginase pharmacokinetics and pharmacodynamics in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Clin Pharmacol Ther* , 86 (6), 651-658.
60. Panosyan , E., Seibel , N., Martin-Aragon , S., Gaynon , P., Avramis , I., Sather , H., i dr. (2004). Asparaginase antibody and asparaginase activity in children with higher-risk acute lymphoblastic leukemia: Children's Cancer Group Study CCG-1961. *J Pediatr Hematol Oncol* , 26 (4), 217-226.
61. Panosyan, E., Grigoryan, R., Avramis, I., Seibel, N., Gaynon , P., Siegel , S., i dr. (2004). Deamination of glutamine is a prerequisite for optimal asparagine deamination by asparaginases in vivo (CCG-1961). *Anticancer Res* , 24 (2C), 1121-1125.
62. Payne , J., & Vora , A. (2007). Thrombosis and acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* , 138 (4), 430-445.

63. Pieters , R., Hunger , S., Boos , J., Rizzari , C., Silverman , L., Baruchel , A., i dr. (2011). L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* , 117 (2), 238-249.
64. Pieters, R., & Carroll, W. L. (2010). Biology and treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. U M. J. Coppes, R. E. Ware, & J. S. Dome, *An Update on Pediatric Oncology and Hematology* (Svez. 24, str. 1-18). New York: Saunders.
65. Pratt , C., & Johnson , W. (1971). Duration and severity of fatty metamorphosis of the liver following L-asparaginase therapy. *Cancer* , 28 (2), 361-364.
66. Pui , C., Burghen , G., Bowman , W., & Aur , R. (1981). Risk factors for hyperglycemia in children with leukemia receiving L-asparaginase and prednisone. *J Pediatr* , 99 (1), 46-50.
67. Pui , C., Relling , M., Behm , F., Hancock, M., Boyett , J., Raimondi , S., i dr. (1995). L-asparaginase may potentiate the leukemogenic effect of the epipodophyllotoxins. *Leukemia* , 9 (10), 1680-1684.
68. Rabin , K. (2012). Attacking remaining challenges in childhood leukemia. *N Engl J Med* , 366 (15), 1445-1446.
69. Raetz, E. A., & Salzer, W. L. (2010). Tolerability and Efficacy of L-Asparaginase Therapy in Pediatric Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* , 32 (7), 554-563.
70. Redner , A. (2011). Leukemias. U P. Lanzkowsky, *Manual of Pediatric Hematology and Oncology* (str. 518-549). Oxford: Elsevier.
71. Rizzari, C., Conter, V., Stary, J., Colombini, A., Moericke, A., & Schrappe, M. (2013). Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Curr Opin Oncol* , 25 Suppl 1, 1-9.
72. Saarinen-Pihkala , U., Gustafsson , G., Carlsen , N., Flaegstad , T., Forestier , E., Glomstein , A., i dr. (2004). Outcome of children with high-risk acute lymphoblastic leukemia (HR-ALL): Nordic results on an intensive regimen with restricted central nervous system irradiation. *Pediatr Blood Cancer* , 42 (1), 8-23.
73. Sahu , S., Saika , S., Pai , S., & Advani , S. (1998). L-asparaginase (Leunase) induced pancreatitis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol* , 15 (6), 533-538.
74. Salzer , W., Asselin , B., Supko , J., Devidas , M., Kaiser , N., Plourde , P., i dr. (2013). Erwinia asparaginase achieves therapeutic activity after pegaspargase allergy: a report from the Children's Oncology Group. *Blood* , 122 (4), 507-514.
75. Salzer, W., Seibel, N., & Smith, M. (2012). Erwinia asparaginase in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Expert Opin Biol Ther* , 12 (10), 1407-1414.
76. Schrey , D., Borghorst , S., Lanvers-Kaminsky , C., Hempel , G., Gerss , J., Möricke , A., i dr. (2010). Therapeutic drug monitoring of asparaginase in the ALL-BFM 2000 protocol between 2000 and 2007. *Pediatr Blood Cancer* , 54 (7), 952-958.

77. Seibel, N., Steinherz, P., Nachman, J., Sather, H., DeLaat, C., Ettinger, L., i dr. (2008). Early postinduction intensification therapy improves survival for children and adolescents with high-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Blood* , 111 (5), 2548-2555.
78. Shuster , J., Wacker , P., Pullen , J., Humbert , J., Land , V., Mahoney , D., i dr. (1998). Prognostic significance of sex in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group Study. *J Clin Oncol* , 16 (8), 2854-2863.
79. Silverman , L., Gelber , R., Dalton , V., Asselin , B., Barr , R., Clavell , L., i dr. (2001). Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood* , 97 (5), 1211-1218.
80. Silverman, L. B. (2009). Acute Lymphoblastic Leukemia. U S. H. Orkin, D. E. Fisher , T. A. Look, S. Lux IV, D. Ginsburg, & D. G. Nathan, *Oncology of Infancy and Childhood* (str. 297-314). Philadelphia: Saunders.
81. Silverman, L. B., Supko, J. G., Stevenson, K. E., Woodward, C., Vrooman, L. M., Neuberg, D. S., i dr. (2010). Intravenous PEG-asparaginase during remission induction in children and adolescents with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. *Blood* , 115 (7), 1351-1353.
82. Smith, O. P., & Hann, I. M. (2006). Clinical features and therapy of lymphoblastic leukemia. U R. J. Arceci , I. M. Hann , & O. P. Smith , *Pediatric Hematology* (str. 450-481). Oxford: Blackwell Publishing .
83. Sobin , L., & Kidd , J. (1966b). Alterations in protein and nucleic acid metabolism of lymphoma 6C3HED-og cells in mice given guinea pig serum. *J Exp Med* , 123 (1), 55-74.
84. Sobin , L., & Kidd , J. (1966a). The incorporation of L-asparagine-14C by lymphoma 6C3HED cells: its inhibition by guinea pig serum. *Cancer Res* , 26 (2), 208-211.
85. Soniyambi, A., Lalitha, S., Pravesh, B., & Priyadarshini, V. (2011). Isolation, production and anti tumor activity of L-asparaginase of *Penicillium* sp., *International Journal of Microbiological Research* , 2 (1), 38-42.
86. Stams, W. A., den Boer , M. L., Holleman , A., Appel , I. M., Berna Beverloo , H., van Wering , E. R., i dr. (2005). Asparagine synthetase expression is linked with L-asparaginase resistance in TEL-AML1-negative but not TEL-AML1-positive pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* , 105 (11), 4223-4225.
87. Stary, J., Zimmermann, M., Campbell, M., Castillo, L., Dibar, E., Donska, S., i dr. (2013). Intensive Chemotherapy for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Results of the Randomized Intercontinental Trial ALL IC-BFM 2002. *J Clin Oncol* .
88. Tong , W., Pieters , R., Kaspers , G., te Loo , D., Bierings , M., van den Bos , C., i dr. (2014). A prospective study on drug monitoring of PEGasparaginase and Erwinia asparaginase and asparaginase antibodies in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* , 123 (13), 2026-2033.

89. Vieira Pinheiro , J., Ahlke , E., Nowak-Göttl , U., Hempel , G., Müller , H., Lümekemann , K., i dr. (1999). Pharmacokinetic dose adjustment of Erwinia asparaginase in protocol II of the paediatric ALL/NHL-BFM treatment protocols. *Br J Haematol* , 104 (2), 313-320.
90. Vieira Pinheiro , J., Wenner , K., Escherich , G., Lanvers-Kaminsky , C., Würthwein , G., Janka-Schaub , G., i dr. (2006). Serum asparaginase activities and asparagine concentrations in the cerebrospinal fluid after a single infusion of 2,500 IU/m(2) PEG asparaginase in children with ALL treated according to protocol COALL-06-97. *Pediatr Blood Cancer* , 46 (1), 18-25.
91. Vrooman , L., Kirov , I., Dreyer , Z., & Kelly , K. (2013). Preliminary results of a pharmacokinetic study of intravenous asparaginase Erwinia chrysanthemi following allergy to E.coli-derived asparaginase in children, adolescents, and young adults with acute lymphoblastic leukemia or lymphoblastic lymphoma. *Blood* , 122 (21), Abstract 3904.
92. Vrooman , L., Stevenson , K., Supko , J., O'Brien , J., Dahlberg , S., Asselin , B., i dr. (2013). Postinduction dexamethasone and individualized dosing of Escherichia Coli L-asparaginase each improve outcome of children and adolescents with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia: results from a randomized study--Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 00-01. *J Clin Oncol* , 31 (9), 1202-1210.
93. Vrooman, L. M., Supko, J. G., Neuberg, D. S., Asselin, B. L., Athale, U. H., Clavell, L., i dr. (2010). Erwinia Asparaginase after Allergy to E coli Asparaginase in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatr Blood Cancer* , 54 (2), 199-205.
94. Wacker, P., Land, V. J., Camitta, B. M., Kurtzberg, J., Pullen, J., Harris, M. B., i dr. (2007). Allergic Reactions to E. coli L-Asparaginase Do Not Affect Outcome in Childhood B-precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* , 29 (9), 627-632.
95. Wang , B., Relling , M., Storm , M., Woo , M., Ribeiro , R., Pui , C., i dr. (2003). Evaluation of immunologic crossreaction of anti-asparaginase antibodies in acute lymphoblastic leukemia (ALL) and lymphoma patients. *Leukemia* , 17 (8), 1583-1588.
96. Willer , A., Gerss , J., König , T., Franke , D., Kühnel , H., Henze , G., i dr. (2011). Anti-Escherichia coli asparaginase antibody levels determine the activity of second-line treatment with pegylated E coli asparaginase: a retrospective analysis within the ALL-BFM trials. *Blood* , 118 (22), 5774-5782.
97. Woo , M., Hak , L., & Storm , M. (1999). Anti-asparaginase (ASP) antibodies do not impact event-free survival (EFS) in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *J Clin Oncol* , 18, 567a.
98. Woo , M., Hak , L., Storm , M., Evans , W., Sandlund , J., Rivera , G., i dr. (1998). Anti-asparaginase antibodies following E. coli asparaginase therapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* , 12 (10), 1527-1533.



99. Woo , M., Hak , L., Storm , M., Sandlund , J., Ribeiro , R., Rivera , G., i dr. (2000). Hypersensitivity or development of antibodies to asparaginase does not impact treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* , 18 (7), 1525-1532.
100. Wu , S., Chen , A., Peng , C., & Wu , K. (2008). Octreotide therapy in asparaginase-associated pancreatitis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* . , 51 (6), 824-825.
101. Yellin , T., & Wriston , J. (1966). Antagonism of purified asparaginase from guinea pig serum toward lymphoma. *Science* , 151 (3713), 998-999.
102. Zalewska-Szewczyk , B., Andrzejewski , W., Młynarski , W., Jedrychowska-Dańska , K., Witas , H., & Bodalski , J. (2007). The anti-asparagines antibodies correlate with L-asparagines activity and may affect clinical outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* , 48 (5), 931-936.
103. Zalewska-Szewczyk, B., Gach, A., Wyka, K., Bodalski, J., & Młynarski, W. (2009). The cross-reactivity of anti-asparaginase antibodies against different l-asparaginase preparations. *Clin Exp Med* , 9 (2), 113-116.

## **11. ŽIVOTOPIS**

Rođena sam 8.4.1990. godine u Zagrebu. Maturirala sam 2009. godine u II. gimnaziji u Zagrebu te upisala Medicinski fakultet u Zagrebu. Tijekom studija radila sam kao demonstrator na Katedri za fiziologiju i imunologiju, Klinici za internu medicinu i Klinici za pedijatriju. Pokazala sam veliki interes za područja interne medicine, hematologije i pedijatrije. Sudjelovala sam u studentskoj razmjeni na Sveučilišnoj bolnici u Hamburgu gdje sam boravila na Klinici za hematologiju i onkologiju. Dobitnica sam Dekanove nagrade za najbolju studenticu treće godine studija (akad. god. 2011./2012.).